

VOLUME 13
NUMBER 1
2005

<http://www.blood-sub.jp/>

会告

- 総説: 血液事業の新しい動き
8項目の安全強化対策について
- 血液代替物としての治療用ヒト抗体の
開発
- 血清アルブミンの構造特性と医薬への
応用
- ヒト赤血球由来ヘモグロビンによる
ヘモグロビン小胞体の開発と酸素輸液
としての応用
- 完全合成型人工酸素運搬の開発

Announcement

Review:

- New Movement of Blood Program
Eight Strategies for the Sake of
Safer Blood Products
- Development of Therapeutic Human
Antibodies Against Various Diseases
as Blood Substitutes
- Structural Properties and
Pharmaceutical Application of Human
Serum Albumin
- Development and clinical application
of hemoglobin vesicles as an oxygen
carrier using hemoglobin derived from
human red blood cells
- Development of Totally Synthetic
Artificial Oxygen Carrier

人工血液

第 13 卷 第 1 号 2005 年 3 月

目次

会告	2
総説	血液事業の新しい動き	
	8 項目の安全強化対策について	東 寛 6
	血液代替物としての治療用ヒト抗体の開発	黒澤良和 13
	血清アルブミンの構造特性と医薬への応用	安楽 誠 22
	ヒト赤血球由来ヘモグロビンによるヘモグロビン	
	小胞体の開発と酸素輸液としての医療応用	高木智史 29
	完全合成型人工酸素運搬の開発	甲斐俊哉 34

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 13 No. 1 March, 2005

Contents

<i>Announcement</i>	2
<i>Review: New Movement of Blood Program</i>		
	<i>Eight Strategies for the Sake of Safer Blood Products</i>	
	<i>Hiroshi Azuma</i> 6
	<i>Development of Therapeutic Human Antibodies against Various Diseases as Blood Substitutes</i>	<i>Yoshikazu Kurosawa</i> 13
	<i>Structural Properties and Pharmaceutical Application of Human Serum Albumin</i>	<i>Makoto Anraku</i> 22
	<i>Development and Clinical Application of Hemoglobin Vesicles as an Oxygen Carrier Using Hemoglobin Derived from Human Red Blood Cells</i>	<i>Satoshi Takagi</i> 29
	<i>Development of Totally Synthetic Artificial Oxygen Carrier</i>	
	<i>Toshiya Kai</i> 34

会 告

第12回 日本血液代替物学会年次大会

会 期：平成17年6月6日(月)、7日(火)

会 場：早稲田大学 国際会議場3階 第1、第2会議室

大会長：武岡 真司(早稲田大学 理工学術院 教授)

プログラム(案)

平成17年6月6日(月)

・ 午前の部

9:00~9:20 開会

9:20~11:00 ワークショップ 1. 臨床に向けた赤血球代替物の開発動向

W-1 「MalPEG-hemoglobin(MP4) Improves Hemodynamics, Acid-base Status, and Survival After Uncontrolled Hemorrhage in Anesthetized Swine」(Winslow RM, Sangart)

W-2 「ナノカプセル型人工酸素運搬体の開発状況」 (緒方 嘉貴, テルモ(株))

W-3 「ヒトヘモグロビン小胞体開発の新局面」 (高木 智史,(株)オキシジェニクス)

W-4 「人工酸素運搬体の大量製造への取り組み」 (甲斐 俊哉, ニプロ(株))

パネル討論(30分間)

11:00~11:30 教育講演 1.

「Blood Flow Regulatory Mechanisms in the Microcirculation and Blood Substitutes」
(Johnson P, UCSD)

11:30~12:10 大会長講演

「分子集合科学を利用した人工血液の創製」(武岡 真司, 早大理工)

12:10~13:30 昼食

(12:15~12:45 理事会、12:45~13:15 評議員会)

・ 午後の部

13:30~14:00 会長講演

「人工酸素運搬体の製造、安全性、有効性評価に関する本学会の取り組み」
(小林 紘一, 慶大医)

14:00~15:40 ワークショップ 2. 人工酸素運搬体の製造に関するパネル討論

W-5 「製造に関するガイドンス」(高折 益彦, 東宝塚さとう病院)からの学会案の提示に対して、開発企業、臨床医、日赤関係者、FDA関係者、薬事専門家によるパネル討論

15:55~17:10 シンポジウム 1. 赤血球代替物の安全性

S-1 「リポソーム封入ヘモグロビン(TRM645)のヒト免疫機能に及ぼす影響：ヒト免疫系再構築マウス(NOG)における検討」(川口 章, 東海大医)

S-2 「Hb小胞体が免疫系に及ぼす影響について」(池田 久實, 北海道赤十字BC)

S-3 「マウスにおけるHb小胞体の血中滞留性と組織移行性について」(安楽 誠, 熊大医薬研)

- S-4 「Hb小胞体による50%出血ショック蘇生後の回復過程」(酒井 宏水, 早大理工総研)
- S-5 「ウサギ出血性ショックモデルに対する人工赤血球投与後の臓器酸素分圧と血漿浸透圧への影響」(寺嶋 克幸, 日本医大)

17:10~18:10 シンポジウム 2 . 赤血球代替物の適応

- S-6 「ビーグル犬出血性ショックモデルを用いたHb小胞体の評価」(堀之内 宏久, 慶大医)
- S-7 「ラット摘出還流心臓での虚血 再還流障害に対するHb小胞体の保護効果」
(加藤 隆一, 防衛医大)
- S-8 「人工心肺による体外循環モデルと人工赤血球による充填効果」(山崎 真敬, 慶大医)
- S-9 「リポソーム封入ヘモグロビンの発症後投与はサル脳虚血再還流障害を緩和する
- PETを用いた酸素動態の検討 - 」(川口 章, 東海大医)

． 夕方の部

18:15~19:45 ポスターセッション (第2会議室)
募集中 (現在まで20件程度)

平成17年6月7日(火)

． 午前の部

9:00~10:00 一般演題

- G-1 「部位特異的アミノ酸置換を利用した新しいアルブミン - ヘムの合成と酸素結合」
(小松 晃之, 早大理工総研)
- G-2 「組換え型アルブミン二量体の体内動態特性について」(浦田 由紀乃, 熊大医薬研)
- G-3 「人工酸素運搬体による腫瘍の酸素化」(泉 陽太郎, 慶大医)
- G-4 「低酸素親和性赤血球輸血による敗血症効果」(黄 菲, 順大医)

10:00~10:20 招待講演 1 .

「Conjugate of Bovine Hemoglobin and Human Serum Albumin as a Candidate for Blood Substitute」(Su Z, 中国科学院)

10:20~10:40 招待講演 2 .

「Preparation of Uniform Sized Microcapsules Containing Protein or Peptide Drug for Controlled Release」(Ma G, 中国科学院)

10:40~11:10 招待講演 3 .

「Oxygen Transport and Release by Blood Substitute: Effect of Oxygen Affinity」
(Intaglietta M, UCSD)

11:10~12:10 ワークショップ 3 . ウイルス・プリオン対策

- W-6 「人工酸素運搬体とウイルス・バリデーション」(阿部 英樹, 北海道赤十字BC)
- W-7 「A New Assay for the Detection of Misfolded Prion Protein (PrPsc) in Blood」
(Rudolph AS, Adlyfe Inc.)

討論 (特別発言も含む)(25分間)

12:10~13:30 昼食

(12:15~12:45 総会)

午後の部

13:30～14:00 教育講演 2 .

「付加価値赤血球製剤への期待と展開」(末松 誠, 慶大医)

14:00～15:50 シンポジウム 3 . 血小板代替物

S-10 (総論)「血小板代替物の開発状況」(池田 康夫, 慶大医)

S-11 「rGPIb リポソームの機能評価」(齊藤 浩, 三菱ウェルファーマ(株))

S-12 「血小板代替物のin vitro、in vivo評価」(半田 誠, 慶大医)

S-13 「止血過程における血小板代替物の超微細構造解析」(鈴木 英紀, (都)臨床研)

S-14 「人工血小板の止血機能増強、血栓性におよぼすvon Willebrand因子 - GPIb およびコラーゲン受容体の作用の差異」(田村 典子, 東海大医)

S-15 「人工血小板の輸送と粘着のバイオメカニクス」(谷下 一夫, 慶大理工)

S-16 「Freeze-Dried Platelet Derivatives for Hemostatic and Growth Factor Application」

(Rudolph AS, Adlyfe Inc.)

16:00～16:30 教育講演 3 .

「幹細胞から血球細胞の誘導」(千葉 滋, 東大病院)

16:30～17:35 シンポジウム 4 . 抗体医薬など蛋白質製剤の開発

S-17 (総論)「各種感染症に対する治療薬ヒト抗体の開発状況」(黒澤 良和, 藤田保健衛生大医)

S-18 「肝癌に対する治療薬としてのヒト抗体の開発状況」(杉岡 篤, 藤田保健衛生大医)

S-19 「血管炎治療のためのガンマグロブリンの人工化」(鈴木 和男, 国立感染研)

S-20 「遺伝子組換えアンチトロンビンの開発」(大井 英之, 三菱ウェルファーマ(株))

17:35～17:40 閉会の辞

研究発表者への注意

口頭発表の受付は終了しました。現在、ポスター発表を受付けています。

ポスター発表用予稿原稿電子投稿締切 5月9日(月) 15時厳守

学会のホームページ、Information(学会のお知らせ)の電子入稿サイトより入稿フォーマットのファイルをダウンロードし、ご投稿ください。(Windows Word対応)

会期中の行事

・理事会

日時 6月6日(月) 12:15～12:45

会場 早稲田大学 国際会議場4階

・評議員会

日時 6月6日(月) 12:45～13:15

会場 早稲田大学 国際会議場4階

・総会

日時 6月7日(火) 12:15～12:45

会場 早稲田大学 国際会議場3階 第1会議室

・懇親会

日時 6月7日(火) 18:00~20:00
会場 リーガロイヤルホテル東京 2階 ダイヤモンド
参加費 無料

参加登録申込要綱

第12回日本血液代替物学会年次大会への参加は、全員参加登録が必要です。本号参加登録申込書(郵便振込取扱票)を使用し、お申込みください。当日の受付は混雑することがありますので、なるべく事前にお申込み下さいますようお願い申し上げます。

参加登録料

申込期間	3月1日~5月17日	5月18日~会期中
参加登録料	¥9,000	¥10,500

・参加登録料送金に関する注意

- 1) 本号挿入の参加登録申込書を使用してください。一人1枚使用のこと。不足の場合はご請求下さい。
- 2) 同参加登録申込書(郵便振込取扱票)を使用して、送金は5月17日までとさせていただきます。その後は、会期中、会場受付にてお支払いください。
- 3) 郵便振込取扱票の受領書を領収書にかえさせていただきます。特別に書類が必要な場合には、事務局までお問合せ下さい。

問合せ先

〒169-8555

東京都新宿区大久保3-4-1 早稲田大学 理工学部65-208室

第12回 日本血液代替物学会年次大会事務局

担当 岡村 陽介、阿閉 友保

TEL & FAX 03-5286-3217

e-mail: info@blood-sub.jp (血液代替物学会へのご質問・ご要望等)

meeting@blood-sub.jp (第12回年次大会に関するご質問・ご要望等)

学会のホームページにて、最新のお知らせ、注意事項、プログラムなどを掲載していきます。併せてご確認、ご利用下さい。

<http://www.blood-sub.jp/>

血液事業の新しい動き - 8項目の安全強化対策について -

New Movement of Blood Program - Eight Strategies for the Sake of Safer Blood Products -

東 寛, 池田久實

Hiroshi Azuma, Hisami Ikeda

和文抄録

2005年4月に完全施行される改正薬事法では、ヒトその他の生物に由来するものを原材料として製造される医薬品および医療機器等のうち保健衛生上、特別の注意を要するものを生物由来製品と定義し、さらにその中に特定生物由来製品というものを定義した。これは生物由来製品のうち市販後に当該製品による保健衛生上の危害の発生または拡大を防止するための措置を講ずることが必要なものを指す。全ての血液製剤を含めて50品目がこの特定生物由来製品に入る。日本で検討されているリポソーム包埋型の人工赤血球が、ヒト由来のヘモグロビンを使用している以上は、この特定生物由来製品の範疇に入る可能性があると考えられる。従って現在、日赤で取り組もうとしている安全強化対策がどのようなものであるかを知ることは重要であろう。そこで、本稿では日本赤十字社が、昨年から、取り組むことを宣言している8項目の血液製剤の安全性強化対策1) 遡及調査自主ガイドラインの作成、2) 新鮮凍結血漿の貯留保管の実施、3) 輸血用血液の感染性因子の不活化、4) 核酸増幅検査の精度向上、5) 複数地域の医療機関の協力を得ての輸血後感染症に関する全数調査の実施、6) E型肝炎ウイルスの疫学的調査の実施、7) 保存前白血球除去の開始、8) 献血受け付け時の本人確認の実施への試行、について、その経緯も振り返りながら解説する。

Abstract

In the revised Pharmaceutical Affairs Law that is supposed to become completely effective as from April 2005, it is described that among pharmaceuticals and medical equipments made from materials derived from human and other animals, those to which we should pay special attention with regards to health and hygiene are defined as biological products. In addition, among biological products, the specific biological products are defined. Once the specific biological products are on the market, one should take actions to prevent the occurrence and/or spread of any damages to health and hygiene caused by these products. Fifty items including all the blood products are recognized as specific biological-products. Since liposome encapsulated artificial red blood cells(ARCs) in Japan contains hemoglobin molecules which are derived from human red blood cells, it is probable that this type of ARCs is also categorized as a specific biological product. Therefore, it may be important for us to share the information on the eight strategies that Japanese Red Cross is about to take to enhance the safety of blood products.

Keywords

Look back, Quarantine, Inactivation, NAT, Hepatitis E virus, Prestorage leukoreduction

始めに

日本赤十字社は2004年10月1日、輸血用血液へのウイルス混入などがあつたときに素早く意思決定して安全対策を行えるよう、社内で独立した権限を持つ「血液事業本部」を発足させ、

その意思決定機関として「血液事業経営会議」を設置、この経営会議が血液事業全般の責任を持つこととした。今後は経営会議で血液の安全対策や効率的な経営などを話し合つて方針を決める。

血液事業の有り様は、ここ数年の間に大きく変化した。最大の変化は、血液新法と改正薬事法が施行されることである。まず、血液新法であるが、これは1956年（昭和31年）に制定された「採血および供血あっせん業取締法」が47年ぶりに改正され、「安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律」として改訂されたものである。基本理念として血液製剤の安全性の向上、安定供給の確保、適正使用の推進が掲げられ、血液事業に携わる関係者、特に国の責任が明確化された。すなわち、国は、安全性の向上、安定供給の確保に関する基本的・総合的施策の策定・実施を行うことがうたわれている。ところで2003年7月にこの法律が施行される少し前に、輸血用血液製剤による感染症の発生と日赤の遡及調査の不備が厚生省により指摘されたことは偶然ではない。古い法律では、採血業は大臣の許可のもとに営むことができたのであり、法律上は、国は許可をする立場であり、現場の責任者として行動する必要性が無かったのである。法律の公布が確定することをきっかけとして、国は初めて、日赤が行ってきた血液のスクリーニングシステムや輸血感染症の実態に対して責任ある立場にたったということである。官として法律に従って動いたとも言える。

事の発端はともかく、血液製剤の安全性が今まで以上に厳しく問われ、膨大な数の遡及調査が行われ、日本に於ける輸血感染症の実態が把握されつつある。また、完璧な感染症スクリーニングというものも、現状ではあり得ないことが改めて関係者の知るところとなった訳である。

改正薬事法の完全施行は2005年4月からである。あらたな薬事法では、ヒトその他の生物に由来するものを原材料として製造される医薬品医療機器等のうち保健衛生上、特別の注意を要するもの（遺伝子組み換え製剤、ワクチン、トキシソイドなど）を生物由来製品と定義し、さらにその中に特定生物由来製品というものを定義した。これは生物由来製品のうち市販後に当該製品による保健衛生上の危害の発生または拡大を防止するための措置を講ずることが必要なものを指す。具体的には全ての血液製剤、そして遺伝子組み換えの第8因子製剤あるいは第9因子製剤といった50品目がこの特定生物由来製品に入る。現在、日本で検討されているリボソーム包埋型の人工赤血球が、ヒト由来のヘモグロビンを使用している以上は、この特定生物由来製品の範疇に入る可能性が非常に高いと考えられる。すなわち通常の製剤としての安全性ではなく、特定生物由来製剤として、既存の血液製剤と同等かそれ以上の安全性を確保していることがどうしても期待されることになる。人工赤血球に使用するヘモグロビンのソースを何処に求めるかによっても、安全性対策の方向性が異なるわけであるが、少なくとも現時点では、ヒト由来のヘモグロビンを使うことになるので、現在、日赤で取り組もうとしている安全強化対策がどのようなものであるのかを知ることは重要であろう。

日本赤十字社では、昨年、8項目の血液製剤の安全性強化対策に取り組むことを宣言している。その内容は

- 1) 遡及調査自主ガイドラインの作成、
- 2) 新鮮凍結血漿の貯留保管の実施、

- 3) 輸血用血液の感染性因子の不活化、
 - 4) 核酸増幅検査の精度向上、
 - 5) 複数地域の医療機関の協力を得ての輸血後感染症に関する全数調査の実施、
 - 6) E型肝炎ウイルスの疫学的調査の実施、
 - 7) 保存前白血球除去の開始、
 - 8) 献血受け付け時の本人確認の実施への試行
- である。以下に各項目について若干の解説を試みる。

[1] 遡及調査自主ガイドラインの作成

前述の如く、昨年厚生労働省より日赤の遡及調査（Look back）体制の不備を指摘され遡及調査自主ガイドラインを作成することになり、今年（2004年）の8月15日以降は、このガイドラインに基づいて遡及が行われている。その目的は、感染リスクがあると判断された血液製剤について1)それが未使用で有効期限内にあれば直ちに使用停止・回収を行ない、それによる感染の拡大を防ぐこと、2)既に輸血に使用されていた場合には、医療機関にその情報を提供し、その血液が輸血された患者の感染の有無を調査し、感染事実の早期発見、早期治療を可能にしかつ2次感染の防止を図ることである。それでは遡及の開始はどのような情報にもとづいているのかということ、1)献血者の感染症検査（血清学的検査または核酸増幅検査）が陽転化したという情報が得られた場合、2)献血後に献血者が感染症（肝炎等）を発症したという情報が得られた場合（本人からの自己申告等）、3)医療機関からの（輸血後感染の）副作用報告の3つの情報に基づく。今回の遡及対象はB型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus (HBV)）、C型肝炎ウイルス（Hepatitis C virus (HCV)）、ヒト免疫不全ウイルス（Human immunodeficiency virus (HIV)）そして梅毒トレポネーマの4種類であるが、その他の病原体に関してもこのガイドラインに準ずることとなった。以下にB型肝炎について説明するが、まずはじめに感染症マーカーの意味について解説する。従来の考え方では、急性B型肝炎を発症した人の多くは治癒する。完全に治癒した人は、ウイルス抗原であるHBsAg陰性かつ中和抗体であるHBs抗体が陽性で、血中のHBc抗体を測定すると値は低いが検出できるという状態であり、HBc抗体は、昔B型肝炎にかかったことを示す（既往の有無を示す）指標と考えられていた。これらはいずれもウイルスそのものを検出するのではなくあくまでも血清学的検査である。そしてHBc抗体価がある基準値以下の人の血液は、他の血清学的マーカーに問題がなければ輸血用血液として採用されている。一方、核酸増幅検査（Nucleic Acid Amplification Test (NAT)）は血中のウイルスゲノム自体を高感度に検出できる検査法であり、血清学的検査法と比較して明らかに感度が高く、血清学的検査結果がまだ陰性である感染早期（ウイルス血症の時期に）陽性となり、血清学的検査が陽転化して治癒するとウイルスが消失するので陰性になる。一方抗体は治癒後も長く血中に存在し続ける。ウイルスに感染してから、血清学的検査あるいはNAT検査のそれぞれの検査が陽性となるまでの期間は、空白期間（Window period）と呼ばれている。血清学的検査の空白期間はNAT検

査の空白期間より長い。現在日赤ではすべての献血血液について従来の血清学的検査を行い、かつ血清学的検査に合格したものについてHBV, HCV, HIVのプールNAT検査を施行している。ところで、HBc抗体陽性を示す既感染者（治癒したと判断される）の中に、NAT検査をすると微量ながら血中にウイルスの存在している人のいることが最近わかってきている。非常に微量であるため、NAT検査でも結果が一定しないこともある。HBV感染の場合、まず、血清学的検査の空白期間は、検査法の感度にもよるが、現行の日赤スクリーニング法では125日、50プールNATの空白期間は理論的空白期間46日であるが、これは平均値なので、それを2倍した92日と定められた(表1)。

50プールNATが陽転化しかつHBc抗体が高感度法(EIA等)でも検出されない、すなわち急性感染と判断された場合の遡及は最大で血清学的空白期間である125日過去まで遡ることとされた(図1)。なぜなら、この場合の感染時期は血清学的検査の空白期間内に必ず存在すると考えられるからである。その範囲内で前回(プールNAT陰性)およびそこから92日以内のすべての血液を遡及することとなった。一方、HBc抗体が高感度法で検出された場合は、既感染であるので可能な限り遡る。しかし、この場合は過去の感染時期を特定出来ないし、NAT検査で血中のウイルスが検出できたり出来なかつたりする可能性がある。そこで保管検体の個別NATが陰性と判定されるまで遡

表1

	個別NAT	個別NAT(-)	50プールNAT	50プールNAT(-)	血清学的検査	50プールNAT(+)
	WP	遡及期間	WP	遡及期間	WP	遡及期間
HBV	34日*1	68日	46日	92日	8(44-125)日*2	125日
HCV	23日*1	46日	24.8日	50日	8(54-192)日*1	192日
HIV	11日*1	52日*3	14日	58日*3	2(6-38)日*1	68日*3
梅毒					21-35日*4	35日

遡及期間の設定方法

Schreiberの報告したウィンドウ期(WP)は平均値を示すため、個人差による影響およびウイルスの増殖速度を考慮して50プールNAT陰性時期の遡及期間は各WPの2倍の日数とした。また50プールNAT陽性時の遡及期間は血清学的検査のWPの最長期間とする。ただし、HIVについては感染症ウィンドウ期間の2倍に感染時期から感染性ウィンドウ期間にいたる最大値30日を加算した日数とした。

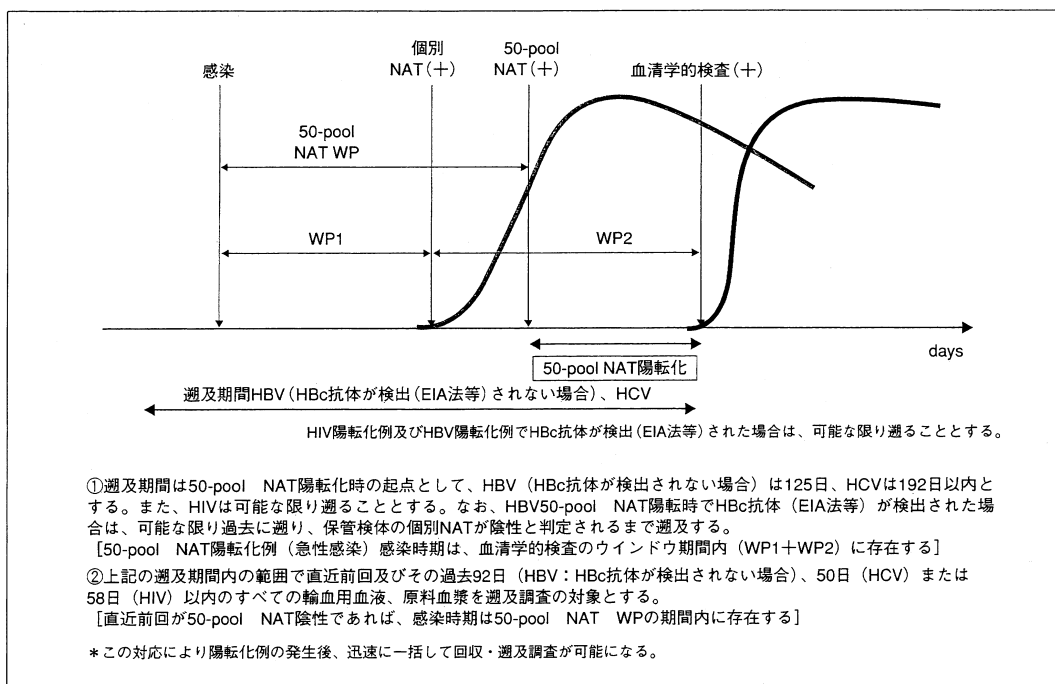
*1 Schreiber GB et al. The risk of transfusion transmitted viral infection. N Eng J Med. 1996;334:1685-90.

*2 50-poolNAT陽性者の追跡調査に基づくRPHAのウィンドウ期の推定値

*3 感染性ウィンドウ期を考慮した遡及期間、今井光信、ヒト免疫不全ウイルス、改訂版、日本輸血学会認定医制度指定カリキュラム、日本輸血学会認定医制度審議会カリキュラム委員会編。2003;285-288.

*4 Orton S, Syphilis and blood donors: What we know, what we do not know, and what we need to know. Transfusion Medicine Reviews 2001;15:282-91.

(血液製剤調査機構だよりNo 82, 輸血用血液等の遡及調査に関するガイドライン資料より引用)



(血液製剤調査機構だよりNo 82, 輸血用血液等の遡及調査に関するガイドライン資料より引用)

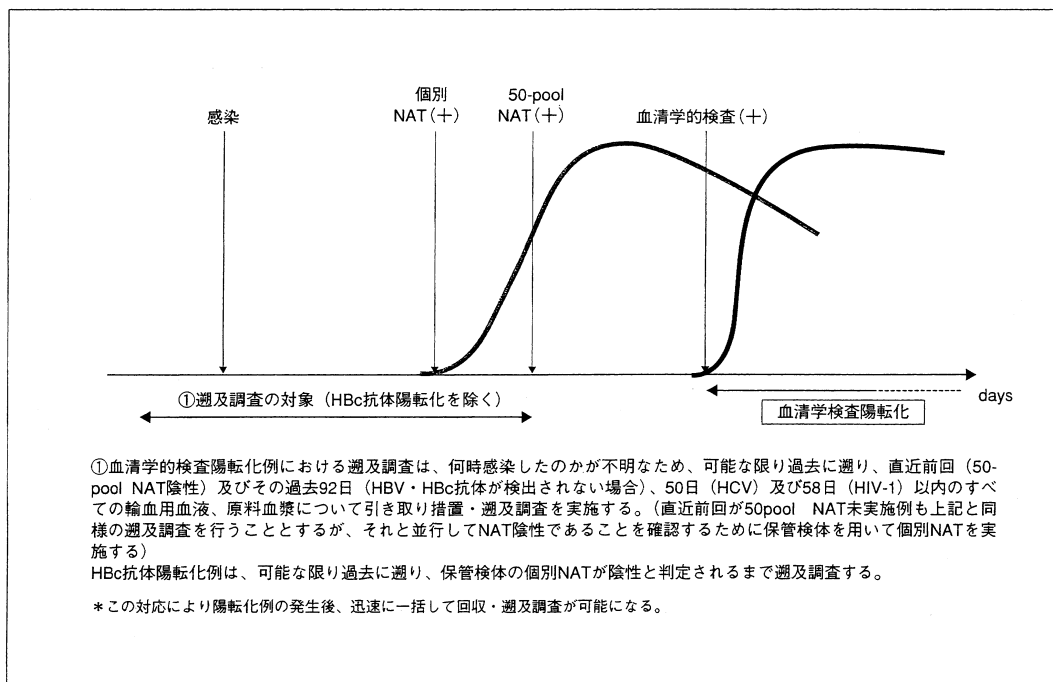
図1. 50-pool NAT陽転化例の遡及期間

及することと決められた。

では、血清学的検査での陽転例はどうか（図2）。これにはまず、HBc抗体のみ単独陽性（陽転化）となる例がある。ここで言うところの血清学的陽転化とは、前回の検査まではあらかじめ定めたHBc抗体の基準値を下回っていたのが、今回の検査値で基準値を越えたことを意味する。既に述べたがHBc抗体価の低いドナー（勿論HBsAgは陰性）の血液は感染性は無いと考えられた結果HBc抗体価が日赤の定めた基準値以下の場合には、輸血用血液として昔から採用していた。抗体価が基準値を下回る人の中には、あるときの検査で基準値を上回ることがある（原因は生理的な変動あるいは検査試薬のlot間のわずかな相違などが考えられる）。つまりガイドラインで遡及の対象となるケースの中には真のHBc抗体陽転化ではなく、既往感染を示すHBc抗体価が検出されるが基準値以下であったのがある時の検査で基準値を越える値をとったケースが含まれる。このような場合にもやはり何時感染したかは特定できないので、可能な限り過去へ遡り、保管検体の個別NATが陰性と判断されるまで遡及することとなった。次にHBs抗原のみ陽転またはHBs抗原とHBc抗体が陽転した場合は、同じく感染時期は特定出来ないでまず可能な限り遡り、前回および前回からプールNAT空白期間である92日以内の全ての血液製剤、原料血漿について回収措置・遡及を行うこととなった。この遡及ガイドラインは50プールNATを踏まえて捻出されたが、現在は既に20プールNATを行っている。

[2] 新鮮凍結血漿の貯留保管の実施

献血された血液のうち血漿成分の一部はアルブミン等の原料血漿として大量に貯留されたのち、血漿分画センターでアルブミンや第8因子製剤になる。これらはその製造過程で、Solvent/Detergent処理（いわゆるSD処理）¹⁾が施され、A型肝炎ウイルスやパルボウイルスB19等のnon-envelope virusを除いて殆どのウイルス（HIV, HBV, HCV等）が不活化される。しかし、献血で得られた血漿の中には、採取後血漿に分離して速やかに凍結されるものがあり、それを新鮮凍結人血漿（Fresh Frozen Plasma (FFP)）という。この中には血中の凝固因子が活性を保ったまま存在することから臨床の場でよく使用される。しかし、不活化処理は施されているわけでは無い。従って、ドナーが採血時にウィンドウ期間にあった場合には、微量のウイルスが混入していることになる。FFPの有効期間は1年間となっており、もしドナーが1回目の献血から1年以内に再度採血にこなければ、この製剤はスクリーニングの網から漏れて、患者に投与される事になる。言い換えると、1年以内に献血にきて、スクリーニングでウイルス陽性となり、遡及のシステムが機能し、その製剤がまだ未使用であった場合のみ遡及の網にかかる。この解決策として、日赤では、FFPの6ヶ月貯留保管（Quarantine）を行う事にした。2ヶ月間以上貯留保管したFFPの供給は2004年（平成16年）1月から開始しているが、段階的に期間を延長し平成17年7月までには6ヶ月間以上貯留保管したFFPのみを供給する予定となっている。つまり、採血後6ヶ月間はその製剤を出庫しないことにより、遡及が効果を奏する可能性をできるだけ高めようということである。果た



（血液製剤調査機構だよりNo 82, 輸血用血液等の遡及調査に関するガイドライン資料より引用）

図2. 血清学的検査陽転化例の遡及期間

して、この試みが非常に有効に働くかどうかは懐疑的な意見もあるが、2002年6月から2003年7月までの献血者約580万人中、0.1%が適及調査対象となっており、うち26.8%が6ヶ月以内に再来していることから、理屈としては、安全性の向上につながると思われる。ちなみに日本で使われる全ての原料血漿については2000年以後6ヶ月間の保管後に使用する体制が整っている。

[3] 輸血用血液の感染性因子の不活化

感染性因子の不活化 (Inactivation) 技術は、製剤中に混入しているウイルス・細菌などの微生物 (あるいはリンパ球等) をあますところなく増殖不能にしてしまう技術であり、血液製剤の安全性の向上への期待は非常に大きい。我が国の血漿分画製剤は、先に述べた様に、S/D処理が施されており、かつ製造工程の種々の段階でウイルスがどれくらい除去されてゆくかがモデルウイルスを使って検討されている。例えば第8因子製剤のクロスエイト製造工程に於けるウイルス不活化・除去効果を、HCVモデルウイルスであるSindbis virus を使って調べるとS/D処理で $>5.6\log$ 、イムノアフィニティークロマトグラフィーで $>5.2\log$ 、ナノフィルトレーションで $>4.7\log$ で全行程では $15.5\log$ 以上の不活化・除去効果が期待できる²⁾。しかしながら、赤血球製剤、血小板製剤、新鮮凍結人血漿などは、ウイルスの不活化・除去などは施されていない。高感度ウイルス検出法であるNATでも検出不可能な微量の混入ウイルスを不活化することが究極の安全性の確保策として求められている。不活化技術は製剤中の細菌の不活化にも対応している。しかしそれらの短期的、長期的な副作用や製剤の品質への影響についてはまだ検討の余地が残されているようだ。日本赤十字社では、現在欧米で開発されている幾つかの不活化技術のバリデーションを開始したところである。不活化技術としての主流は光増感剤 (メチレンブルー、合成ソラレン誘導体S-59³⁾、リボフラビン⁴⁾) と紫外線等の照射を組み合わせたいわゆる光不活化技術である。メチレンブルーを用いた新鮮凍結血漿の光不活化⁵⁾ はヨーロッパの一部の国 (地域) では既に採用しているところもある。その他の不活化技術は、臨床治験を行っているが、実用化にはまだ時間がかかりそうだ。例えばS-59は安全性への懸念が払拭できていないし、リボフラビンは実際に実用化に至るまでにはまだ時間がかかる見通しである。光不活化法は、光を通さない赤血球製剤には不向きである。ウイルスの不活化に当たって光を必要しないS-303⁶⁾ やInactine⁷⁾ といった物質が開発されている。これらは核酸に直接作用し架橋、修飾するので、赤血球にも応用が可能であるがいずれも治験が中断されていると聞く。従って、現時点では、少なくとも赤血球製剤に関しては、有効な不活化法は存在しないと考えてよい。しかし、人工赤血球の原料としては、赤血球ではなくヘモグロビンを扱うので、むしろ血漿分画製剤に近いものと考えられる。その意味では、赤血球製剤に使用可能な不活化技術は必ずしも必要はないと思われる。

[4] 核酸増幅検査の精度向上

日本赤十字社は1999年10月から数十億円という拠出をして全ての血液製剤に対してNAT検査 (HIV, HBV, HCV) の導入に踏み切った。当初は、プール数500で、2000年2月からはプール数50で行っている。すなわちドナー検体を50人づつプールし、その一部を使ってNAT検査を行っている。従って実際には各々が50倍に希釈されている事になる。

輸血後に医療機関から感染があったと報告された件数でみると (つまりスクリーニング検査をすり抜けた可能性があるもの)、1994年から2000年までの7年間のNAT未実施期間でHBV感染の医療機関からの自発報告例の中で保管検体等にウイルス核酸が検出された例は31例であり (平均すると年間4-5例、頻度的には11万例に1例)、NAT検査開始後は、2001年に5例、2002年に4例、2003年に4例となっており、HBV感染に限って言えばNATは必ずしも劇的な効果を生んでいない。これに対して、HCV感染は57万例に1例、HIV感染は267万例に1例という頻度であったが、NAT開始 (1999年) から2004年4月現在でいまだに報告例がない。すなわちHCVとHIVに関しては安全性を高める上で50プールNATは非常に有効であったと言える。つまり空白期間が効果的に短縮できたという事である。HBVで効果がはっきり出ないのはウイルスのdoubling time がHCVより長いことが原因であるとされている。2004年8月から感度を上げる目的で20プールNATが導入されたのでHBVに関しても明らかに有効であるという結果がえられることが期待されている。理想を言えば個別NATが最良であろう。しかし、NATの原理から明らかなように、未知のウイルスや変異ウイルスに対しては対応できない点は念頭に置くべきである。

[5] 複数地域の医療機関の協力を得ての輸血後感染症に関する全数調査の実施

この調査は2004年1月より期間を限定し、医療機関の協力を得て複数の地域で行っているものである。輸血後感染症と確定するためには、輸血前の血液検査で、当該ウイルスに感染していなかったことが証明されなければならない。輸血後肝炎として報告される症例の多くは輸血前の感染症検査を行っていなかったり、不十分であったりする場合が多かった。また、輸血前の検体を保存していないことも多く、調査が不可能な場合もある。そこで、医療機関で患者様にインフォームドコンセントをとり、輸血前と輸血3ヶ月後の血液を採血し保存する。一方、血液センターでは輸血後3ヶ月の血液検体を受け取り、HBV-DNA (血漿分画センター)、HCV-RNAとHIV-RNA (血液管理センター) の検査をする。以上のことを医療機関と協力して確実に実施するというものである。検査結果が陰性であれば調査終了。陽性であれば医療機関に保存されている輸血前の検体の当該ウイルスの検査をする。その結果が陽性であれば輸血による感染ではないことになる。結果が陰性であれば、輸血による感染が疑われるので対応する献血者全ての保管検体の個別NATを行い、ウイルスが検出されれば、そのウイルスの核酸の塩基配列を決定し患者様から検出されたウイルスの塩基配列

と比較し因果関係を調べる。もし、保管検体からウイルスが検出されなかった場合には、空白期の可能性があるので献血者の献血以降における感染の有無をフォローアップすることになっている。

[6] E型肝炎ウイルスの疫学的調査の実施

北海道室蘭市内の病院で昨年、心臓手術を受けた60歳代の男性が、輸血が原因でE型肝炎に感染、発病していたことが遺伝子レベルで確認され報告された⁸⁾。輸血によるE型肝炎ウイルス(Hepatitis E virus (HEV))の感染が遺伝子レベルで確認されたのは国内外をとおして初めてである。これを契機として、E型肝炎の疫学的調査が開始されることになった。E型肝炎ウイルスは、おもにアジアの発展途上国で見られる、非A非B型の急性流行性肝炎の病因の一つである。先進国でも散発的な症例報告があるが、その多くは輸入感染と考えられていた。発展途上国では主として経口感染がその主な伝搬ルートと考えられているが、散発的なケースの感染経路はいまだ明らかではなく、その解明は今後の疫学的調査に待たなければならない。周知のとおり、肝炎ウイルスとして、HBVとHCVは輸血後肝炎の原因であり、血液センターのウイルススクリーニングに組み込まれている。血液製剤の安全性の向上は、この2つのウイルスとの戦いであったといつてよい。同じく肝炎を発症するA型肝炎ウイルスは、経口感染し感染そのものが一過性であり、輸血による感染が問題とはされていない状況にある。あらたに注目を集めているE型肝炎の致死率は1~2%でA型肝炎の10倍と言われている。また、国内でのIgG抗体保有率は各地域を平均すると5.4%との記載がある⁹⁾。E型肝炎ウイルスは現在のスクリーニングシステムの中には組み込まれていないが、これらのことを考慮すると、日赤での献血者を対象にした疫学調査の結果次第では、今後何らかの形で献血血液のスクリーニングに組み込まれることは十分に考えられる。

[7] 保存前白血球除去の開始

カナダ、イギリス、ドイツ、フランス等の諸外国では保存前白血球除去(Prestorage leukoreduction)を赤血球製剤、血小板製剤、FFP全てについて行っている。国内では1999年6月28日に開催された血液製剤特別部会(現血液事業部会)において導入を進めて行くこととされていた。2003年6月4日の血液事業部会での決定をうけて、保存前白血球除去のための本格的な準備がすすめられている。

輸血に伴う様々な有害事象の原因が、血液製剤中に混入している白血球に起因していることが以前より指摘されていた。例えば、1)白血球により血液製剤そのものの品質を低下させる保存障害がおこる(赤血球溶血、凝集、血小板機能低下など)、2)Cytomegalovirus(CMV)感染症は、白血球内に存在しているウイルスが原因である、3)同種抗原感作の原因の一つは白血球である、4)Graft versus Host disease(GVHD)は輸注された白血球(リンパ球)が原因で発症する、5)白血球はサイトカインを含めた種々の生物反応修飾物質を遊離するので発

熱や蕁麻疹などを誘発する原因ともなりうる。これらのことから病院で血液製剤を使用する場合、白血球除去フィルターが既に広く使用されていたわけである。これがいわゆるベッドサイドフィルトレーションである。しかしながら病院では、全ての輸血製剤について白血球除去(白除)を行っていたわけではなかった。一方、保存前白血球除去は、白血球除去フィルトレーションの操作を血液センターでの採血に引き続いて行うものである。このことにより、全ての血液製剤の中の白血球が一定数以下であることが保証されるようになるとともに白血球に起因すると考えられる有害事象の発生頻度が減少することが期待されるという。しかし、すでに行われているベッドサイドフィルトレーションと比較した場合、保存前に白除することがどれほどの優位性があるかは定かではない。つまり副作用の軽減にどれだけ寄与できるか一定した見解はまだない^{10,11)}。強いて言えば、白血球に起因する品質の低下が確実に防止できるということであろうか。諸外国で日本より早期に保存前白除が導入された背景には、変異型クロイツフェルド・ヤコブ病が輸血により感染するかも知れないという危惧があった。すなわち当初、プリオンが白血球(Bリンパ球や樹状細胞)を介して伝搬する可能性が指摘されたため白血球の除去がプリオン感染を低減する方法の一つと考えられたのである。現在でも、実験的にはbuffy coatは血漿よりも5-7倍感染性が高いと言われている¹²⁾。

さて、血液製剤1バッグあたりに含まれる白血球数は全血で 1×10^9 個、MAPで $1 \times 10^{8-9}$ 個、apheresis PCで $1 \times 10^{3-7}$ 個、新鮮凍結血漿で $1 \times 10^{6-7}$ 個である。今回の低減化の目標値としては血液製剤1バッグあたり 1×10^6 個以下と定められた(薬事・食品衛生審議会血液事業部会 2003年6月4日)。これに伴ってまずはじめに成分血小板製剤(2004年度)、次に成分由来血漿製剤(2005年度)、全血採血由来製剤(2006年度)について低減化を計ろうというスケジュール(案)がたてられ現在準備が進められている。

具体的には2004年5月より白血球除去フィルターが装着された採血キットおよびフィルターが無くとも白血球数の低減化が可能な機種についての確認作業がなされているところである。本稿が出来上がるころには白血球除去血小板製剤が出庫されている事と思われる。いずれにしても、白除による効果は、CMVやYersiniaなどの一部の細菌感染症の危険を低減化することが期待できるが、HIVやHCV除去には勿論無効である。その他の副作用の予防効果については今後明らかになって行くであろう。

[8] 献血受け付け時の本人確認の実施への試行

本人確認実施により期待できる効果は、「責任ある献血」の推進と選及調査の現実性の向上がある。献血者の中には、感染症の検査のために献血したり、自分の住所を偽ったり、他人になりすまして献血する人が少数ながら存在する。献血時に本人確認を実施することでこのような献血者の来所を減少することができると思われる。

例えば、2002年度厚生労働省研究報告「献血者・妊婦に関する

る研究」の結果では、検査サービスを希望された献血者のうち、通知結果が返送されてきた献血者（すなわち住所を偽った献血者）は通知結果が配送された献血者より感染症マーカー陽性率が数倍高い結果となっているという。このことは、遡及不可の例も高くなることを意味している。試行の段階では、証明書提示拒否は全体の1%程度に留まったということから、今後全国的な展開があるものと予想される。

以上、血液事業の展開における新しい動きについて、特に昨年から、その取り組みを宣言している8項目の血液製剤の安全性強化対策について概要を解説した。しかしながらこれらの取り組みを実行するためにそれなりの費用がかかることも忘れてはならない。現在の日本の血液製剤の安全性について言えば、NAT検査の導入により非常に高い水準に達しているのである。既に述べたように、NAT開始前ですら、輸血によるHBV感染の頻度は11万例に1例（0.0009%）であった。50プールNAT検査の導入でさらに低下している（HIV、HCVでは今までのところ0%である）。今後莫大な費用をかけて安全性の向上に取り組んだとしても高々0.0009%の向上が見込まれるのみである。つまりcost-effectivenessを念頭に置いて安全性の向上を考えることが重要である。試算によれば、8項目の取り組みをすべて完結するためには数百億円はかかると言われている。血液の安全性を高める技術の進歩はめざましいものがあるが、一方でそれを導入するための費用の捻出が困難な状況になっているのである。こうした問題の一方で、高齢化社会を目前として今後はドナー不足が深刻な問題となりつつある。Dr. Holland（元米国BloodSource Medical Director）がいみじくも“The safest unit of blood could kill you”¹³⁾と述べているように最も安全な血液を求めるあまり、供給可能な血液そのものが不足してしまうというパラドックスもありうることを忘れてはならないと思う。

まとめ

既に述べたとおり、現在日本で開発されているリポソーム包埋型人工赤血球の酸素運搬を担っている部分はヒト由来ヘモグロビンであることから、その安全性確保については、輸血用血液製剤と類似の考え方が必要となるだろう。一方、言うまでもないが、血液型不適合輸血を心配することなく、緊急時に使用でき、かつ長期保存可能であることは、人工赤血球が持つ極めて大きな利点であり魅力である。それ故に、人工赤血球が種々のハードルを越えてヒト赤血球製剤の代替物として臨床現場で使用される日が遠からず訪れることを願っている。

参考文献

1. Horowitz B, Wiebe ME, Lippin A, et al: Inactivation of viruses in labile blood derivatives. I. Distribution of lipid-enveloped viruses by tri(n-butyl)phosphate detergent combinations. *Transfusion* 1985;25:516-522.
2. 室塚剛志 ウイルス不活化/除去：血漿分画製剤，池田久實 著 輸血医療におけるリスク管理 札幌，エフ・コピント・富士書院 2000;204-211.
3. Corash L: Inactivation of viruses, bacteria, protozoa, and leukocytes in platelet concentrates: current research perspectives. *Transfus. Med Rev* 1999;13:18-30.
4. Goodrich RP: The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. *Vox Sang* 2000;78(Suppl 2)211-215.
5. Lambrecht B, Mor H, Knuver-Hopf J, et al: Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang* 1991;60:207-213.
6. Corash L: Inactivation of viruses, bacteria, protozoa and leukocytes in platelet and red cell concentrates. *Vox Sang* 2000;78(Suppl 2)205-210.
7. Chapman J: Progress in improving the pathogen safety of red blood cell concentrates. *Vox Sang* 2000;78(Suppl 2)203-204.
8. Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H et al: Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 2004;44:934-940.
9. 感染症の話 *Infectious Disease Weekly Report Japan* 2004;6:8-10.
10. Uhlmann EJ, Isgriggs EE, Wallhermfecht M et al: Prestorage universal WBC reduction of BC units dose not affect the incidence of transfusion reactions. *Transfusion* 2001;41:997-1000.
11. Seftel MD, Grove GH, Petraszko T, et al: Universal prestorage leukoreduction in Canada decreases platelet alloimmunization and refractoriness. *Blood* 2004;103:333-339.
12. Seghatchian J: Universal leukodepletion : an overview of some unresolved issues and the highlights of lessons learned. *Transfus Apheresis Sci.* 2003;105-107.
13. Holland PV. The safety unit of blood could kill you. Ikeda H eds 次世代の血液製剤を考える 札幌，エフ・コピント・富士書院 2003;52-60.

血液代替物としての治療用ヒト抗体の開発

Development of Therapeutic Human Antibodies against Various Diseases as Blood Substitutes

黒澤良和

Yoshikazu Kurosawa

和文抄録

組換えDNA技術の進歩により、様々な疾患に対する治療薬としてヒト抗体を単離調製することが可能となった。筆者らは厚生労働省の研究費による人工血液開発研究として「臨床に役立つヒト抗体開発研究」を実施している。具体的には、ファージディスプレイ系を用いた抗体ライブラリー作製を基盤技術として、ウイルス感染症（VZV、インフルエンザウイルス、ロタウイルス）に対してはウイルスを中和する能力のある抗体単離、病原菌毒素（ジフテリア毒素、破傷風毒素、ボツリヌス毒素）に対しては毒素中和抗体、さらにハブ毒中和抗体の単離調製に成功した。単離調製した抗体に関しては、臨床試験を開始すべき段階に達している。一方、細胞膜上に存在する多数の抗原分子に対して網羅的に抗体を単離する技術開発に成功し、その結果癌特異抗原の同定とそれに対する治療用ヒト抗体の同時単離が可能となった。本文では、我々がやっている様々な疾患に対する治療用ヒト抗体単離に関して、研究開発過程の総括及び現状紹介を行う。

Abstract

Recent progress in DNA recombinant technology allows us to prepare therapeutic antibodies against various diseases. We have been working on the project "Development of therapeutic antibodies against infectious diseases" which has been supported by a grant for Research on Pharmaceutical and Medical Safety from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan. By using a phage-display technology, we made various antibody libraries. From them we have already isolated human antibodies against viruses (VZV, influenza virus and rotavirus) bacterial toxins (diphtheria toxin, tetanus toxin and botulinum toxin) and snake venom (habu toxin). In all the cases, isolated antibodies show strong neutralizing activities and we could start clinical examinations. We also succeeded to develop a new method by which we can comprehensively isolate antibodies against virtually all the epitopes present on the cell surface. Using this technology, we have been performing a big project "Isolation of therapeutic antibodies against various cancers." In this review, I summarize a history of our research and discuss the present status of our project.

Keywords

artificial antibodies, antibody libraries, therapeutic antibodies, infectious diseases, cancers

はじめに

厚生労働省（当時厚生省）が平成9年度から高度先端医療研究事業として人工血液開発研究を対象に補助金交付を開始した。研究分野は1. 人工赤血球（酵素運搬）、2. 人工血小板（止血）、3. 人工免疫グロブリンであった。筆者の研究グループは、この事業（分野3）を推進することとなり7年以上にわたって「臨床に役立つヒト抗体開発研究」を実施している。血

液代替物として考えた時に、赤血球及び血小板と抗体は開発内容が大きく異なっている。前者は、健常人血液中の赤血球や血小板の機能をいかに正確に代替し得るものを作り出すかが求められる。後者では対象疾患があり、治療薬として有効に機能する抗体を疾患ごとに作製することが必要となる。抗体は元来生体防御分子であり、病原菌もしくは病原菌が分泌する毒素、そしてウイルスに対して特異的（選択的）に結合し、結果として

藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学研究部門・教授 〒470-1192 愛知県豊明市掛掛町田楽ヶ窪1-98

Yoshikazu Kurosawa, Ph.D

論文受付 2004年11月29日 論文受理 2004年12月16日

殺傷（中和）し最終的に体内から除去する。健康人は、感染後一度発病することはあっても免疫系が機能し、抗体産生が誘導されて治癒する。そこで感染症に対しては、治療薬として抗体開発を目指すより、発症予防を目的にワクチン開発を行うことが主流であり、事実有効である。しかし臓器移植が広く行われ、その際免疫抑制剤が使用されることを含めて、免疫機能が低下した状態にある患者数が増加し、抗体治療薬開発への期待が高まっている。更に、現在特定の毒素に対する特效薬として治療に用いられている抗血清がウマ血清であり、それをヒト抗体に変換する社会的要請もある。

抗体は、抗原に対して $10^9 \sim 10^{10} \text{M}^{-1}$ オーダーの強い結合力を示す。この結合力は、血液（5L）中に当該抗体が7.5-75mg分泌されれば、対象となる抗原分子99%が抗体と結合している状態を作り出せることを意味する。抗体が持つこの高い特異性と強い結合力が注目され、更に1975年に細胞融合を用いたモノクローン抗体作製技術が開発されて様々な分子に特異的に結合する抗体を自在に作製できるようになり、抗体は本来の生体防御分子としてではなく、研究試薬として広く利用されることになった¹⁾。

モノクローン抗体作製が可能となってから、癌を中心として抗体を用いた治療薬開発が広範に試みられた。最近になるまでヒトモノクローン抗体作製は困難であったが、マウス/ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体とタンパク分子全体でなるべくヒト由来部分を多くした抗体作製技術も開発された^{2,3)}。20年以上の長い挫折を繰り返した後、乳癌に対するハーセプチン、Bリンパ腫に対するリツキサンという画期的抗体治療薬が開発された。組換えDNA技術の発展の中で完全ヒト抗体作製も可能となり、製薬企業により現在開発されている薬の20%が抗体であると言われている。本総説では、筆者のグループで得た結果および経験に基づき、様々な疾患に対する抗体治療開発の現状を総括し展望を記述する。

抗体分子と抗体遺伝子

抗体は2本の重（H）鎖と2本の軽（L）鎖からなるタンパク質分子である。それぞれ90-110個のアミノ酸残基からなる球状構造（免疫グロブリンホールド）をしたドメインが数珠状につながっている。L鎖は2個のドメインからなり、H鎖は2個のドメインに続いてヒンジ領域があり、更に2個のドメインがつながっている。両鎖のN末端に位置するドメインは、アミノ酸配列が多様であるために可変（V）領域と呼ばれ、HL両鎖のVドメインが抗原結合部に相当する。C末端側はアミノ酸配列が一定であるために定常（C）領域と呼ばれる。各Vドメインは、2面のシートが向き合った立体構造をしており、ループ部分に相当する3箇所、HL両鎖で計6箇所が凸凹構造をした抗原結合面を作り出す。この部分が抗原相補性決定領域（complementarity-determining regionを略してCDR1, 2, 3）と呼ばれている。CDR領域は長さが一定でない場合も含めて多様なアミノ酸配列をしている。その結果、CDRが作り出す立体構造の多様性の総数は莫大になる。様々な形をした抗原に対して、抗体が特異的に結合する能力を示す理由は、莫大な数の抗

体が存在する結果、相補的な関係にある抗原と抗体が様々な結合力（ファンデルワールス力、水素結合、疎水結合、クーロン力）を通して強固な複合体を形成するためである。

抗体は1本のポリペプチド鎖内にアミノ酸配列が多様なV領域と一定の配列をしたC領域を持つ特徴的な分子である。抗体遺伝子座では、動物進化の中で獲得された様々な機構を導入して、様々な抗原に選択的にかつ強い結合力を示す分子を作り出す。抗体が持つべき特徴は、1.多様な抗原に対して選択的（特異的）にかつ強固に結合できる、2.抗体が対応すべき抗原は、予め決まっていない。換言すれば、生物界で全く新しい分子が出現しても、それと特異的に結合する抗体が存在する、3.抗原が外来分子であるか、自分自身の分子であるか区別する能力を持つ、という3点に集約できる。この点に関して本小文で詳細を説明できないが、免疫システムの真髄であり、治療薬としての抗体を開発する上でこの特徴を理解することが肝心である。V領域の多様性を作り出すために、V領域をコードする遺伝子は断片化（L鎖でV_L, J_L遺伝子、H鎖でV_H, D, J_H遺伝子）され、更にそれぞれ多数化し多様化された⁴⁾。そこで抗体L鎖は、DNA再編成により1組のV_LとJ_L遺伝子が選ばれてV_LJ_L結合が作られる（図1）。抗原結合部位の多様化という視点からは、DNA再編成により作り出されるCDRのアミノ酸配列の種類が問題である。詳細は省くが、ヒトの場合、L鎖が作り出すレパートリー総数は数百種類と考えてよい。

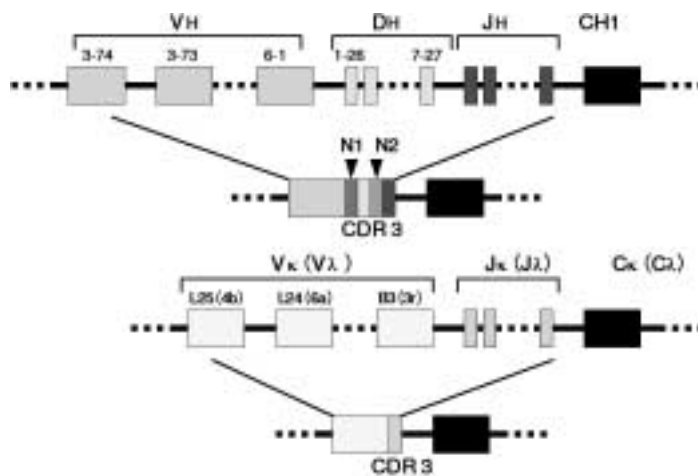


図1. 抗体遺伝子のDNA再編成を示す模式図
DNAの切断再結合が起こる部分は、抗体V領域のCDR3をコードする領域に相当する。

H鎖はV, J遺伝子に加えてD遺伝子が存在するのでレパートリーは更に大きいと予想されるが、実際は遺伝子総数の問題よりDNA組換え機構の相違がより重要である（図2）。D-J_H, V_H-D結合をつくるに際して、末端配列の部分切除（これはL鎖でも見られる）に加えてDNA末端添加酵素（TdT）がN（ヌクレオチドの略）と呼ばれるランダム配列の挿入を行う。鑄型を持たないランダム配列合成は、全生物現象の中でT細胞レセプターと抗体（この分子は進化的に兄弟）のTdTによるこの反応

しか知られていない。結果としてできあがるH鎖V領域レパートリー総数は、造血幹細胞から“独立して分化した”Bリンパ球の総数に匹敵するほど巨大になる。

抗体遺伝子座で起こる以上の分子機構は、未知抗原も含めた多様な抗原に対応する巨大レパートリーを作り出す目標を達成するのに適している。しかし、作り出した抗体群の中に個々の抗原に対応して高い結合力を示す抗体が含まれるかは偶然であり、そのことを必然的にするために体細胞突然変異機構を別途準備している。

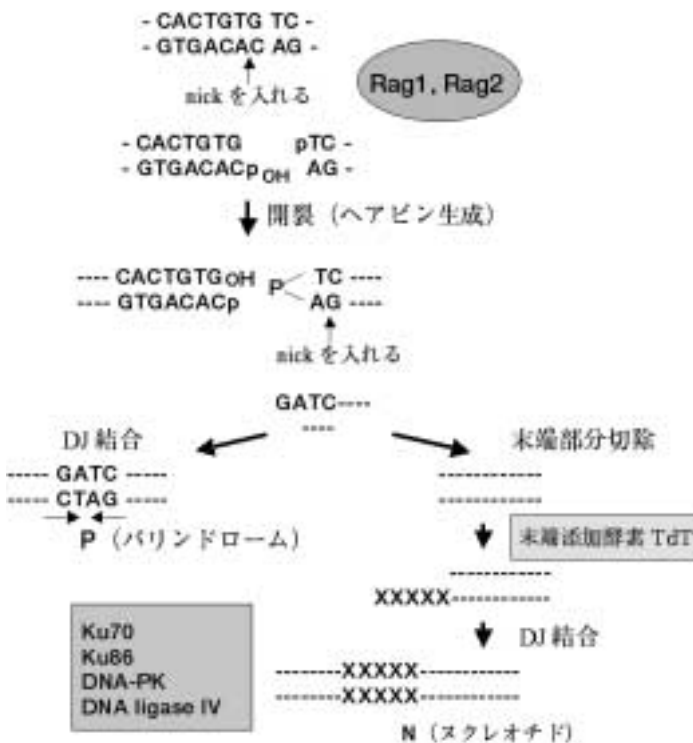


図2. V(D)J DNA再編成過程の模式図
H鎖のD遺伝子とJ遺伝子間でD-J結合が作られる過程を例に示す。L鎖のVLJL結合ではTdTによるランダム配列(N)の挿入は起こらない。

in vivo抗体レパートリーとその二重性

ヒト個体あたりBリンパ球総数は、 10^{11} - 10^{12} と見積もられる。そこで抗体は、アミノ酸配列が異なる場合“異なる抗体”と判断するなら 10^8 種類程度存在するであろう。通常Bリンパ球は比較的短い半減期(2~3週)でturn-overを繰り返しているため、厳密な意味では単一個体中でも抗体の種類は変化している。「充分巨大である」ことがエッセンスである。このような抗体レパートリーは、抗原の存在と無関係に作られているので“ナイーブレパートリー”と呼ばれる。病原菌やウイルス(外来抗原)の侵入が起こると免疫応答が起こる。体液性免疫の最終段階は当該抗原に強固に結合するIgG型抗体の大量分泌である。その結果、外来抗原は除去され、更にその成熟抗体(体細胞突然変異と抗体産生細胞の選別により当該抗原に対する親和力を増した抗体)を産生するB細胞が記憶細胞として残る。突然変異は基本的にはランダムプロセスなので、親和力が増した抗体

産生細胞の選別機構が存在するから意味を持つ。感染症に罹患した後、その治癒過程で出現する中和抗体を大量に産生する形質細胞や記憶細胞が作り出す抗体レパートリーは、“成熟抗体レパートリー”と呼ばれる。このレパートリーは、個々人の免疫学的経歴に大きく依存する。様々な疾患に対して如何にして治療薬となり得る抗体を単離するかについて、in vivoで見られるこの抗体レパートリーの二重性を考慮する必要がある。in vivoで成熟した抗体の性質は、ウイルスや毒素の中和力からみて非常に優れており、感染症に対して患者の体内で治癒に貢献した抗体そのものに匹敵する性能の抗体をin vitroで人工的に作り出すには多大な労力を必要とする。一方、癌特異抗原に対して特別に成熟を起こした抗体が患者体内に存在する証拠はない。

様々なモノクローン抗体単離の技術

治療用抗体単離の前に、より一般的議論から始める。様々な分子(主としてタンパク質)に対して特異的に結合する抗体を入手したいというニーズは高い。混合物の中で標的分子を選択的に同定する試薬として抗体は最も優れており、一般性も高い。精製抗原を有しており、それに対して動物が免疫原性(immunogenicity)を示すという条件を充たせば、動物を抗原で免疫することによりポリクローン抗体の形で抗血清が得られる。最近筆者らは、その抗原の中の抗体によって認識される構造(エピトープ)が幾つあり、それぞれのエピトープに対して何種類の抗体が産生されるかは動物の免疫容量(具体的には、個体あたりのBリンパ球の総数)に大きく影響されることに気付いた。当然のごとくウサギ>ラット>マウスの順である。抗血清の中に含まれる抗体をモノクローン化したい時、従来法では脾臓細胞を癌細胞と融合してハイブリドーマを確立した後、目的とした性質の抗体を分泌している細胞を選別してクローン化する。未だ広く一般化されて使われている訳ではないが、脾臓細胞からファージ抗体ライブラリーを作製した後、スクリーニングにより目的とする性質の抗体を単離することも可能である。この方法は、動物種を問わずに適用できる。ニワトリ、ヒトを含めて抗体をつくる全脊椎動物種で可能である。

細胞融合によるモノクローン抗体作製技術をヒトに応用できないか、多くのグループが試みた。最近ヒトで細胞融合可能なミエローマ株を確立したKarpasによれば、マウスでハイブリドーマ作製が可能になった原因の一つは、M.Potterが確立したmineral oilを腹腔に注入してミエローマの発生を誘発する技術(MOPCと呼ばれたミエローマ株)で得られた細胞は、真の形質細胞(小胞体が非常に発達している)ではなく、細胞分裂速度が速い。一方、通常のヒトミエローマは増殖速度が数倍遅く、そのことが細胞融合株を得にくい真の原因だったと報告している⁵⁾。

より一般的に考えるならば、ある性質をした抗体が動物の血清中に存在するとすれば、その抗体を産生した抗体産生細胞も存在する。対象とする抗原で動物を免疫する操作は、使用者にとって都合の良い性質をしたその抗原に対する抗体を動物の中に作り出す過程であり、その抗体産生細胞の存在数を高める効果をもたらす。モノクローン抗体を作製することは、その細胞

を如何に効率的に不死化して選別するかの問題である。最近、セルソーターを用いて1個の細胞を分別する技術が確立している。蛍光標識抗原を用いてその抗原に結合する抗体産生細胞を1細胞化したのち、EBウイルスで不死化する、または、one cell PCR法で抗体遺伝子を単離することが可能になった。筆者らは後者の技術を確認したが、性能の良い(結合力の強い)抗体を得られていない。この経験を通して筆者は以下のように考えるようになった。モノクローン抗体を得る技術は既に数多くある。細胞融合によりマウスモノクローン抗体を得る技術が一般化し大成功している理由は、抗原で免疫した動物(マウス)の体内で、その抗原に対する性能の良い抗体を産生している細胞数が全Bリンパ細胞(10^8 - 10^9)の中で占める率が充分に高く、プラクティカルな意味で細胞融合により不死化可能な細胞(この総数は限られているはずである)の中に含まれているからである。その点からみて、ヒトのようにマウスの1000倍以上の免疫容量を持つ免疫系を対象としてマウスと同じ細胞融合法で性能の良い抗体をモノクローン化可能であろうか。まして、セルソーターで1細胞化した場合は、実際は全Bリンパ細胞のほんの一部を対象にしているにすぎないのではないか。上記方法で結合力の低い抗体しか得られなかったのはそのためであろう。それと比較して、 10^{10} - 10^{11} の独立したクローンを対象にできる抗体ライブラリー技術は、in vivoでのヒト抗体レパートリーをカバーするのに適している。そこで問題は、充分に大きな抗体ライブラリーを作製した後、如何にして目的とする性質の抗体を得るか、スクリーニング法の開発が重要である。

治療用抗体単離戦略(総論)

既に10を越える治療用抗体が市場に出ているが、全てキメラ抗体かヒト化抗体である。ヒト抗体を作るには、ヒト抗体を作るトランスジェニックマウス(Abgenix社およびキリンとMedarex社共同開発)を用いる⁶⁾、またはファージヒト抗体ライブラリー(CAT社がWinterII特許およびMcCafferty特許と呼ばれる基本特許を有している)を用いる必要がある(図3)⁷⁾。両技術とも確立して既に10年以上経過している。これらの技術を用いて作製されたヒト抗体が、既に臨床試験の最終段階に達している例も幾つかあると報告されている。筆者は、将来的に

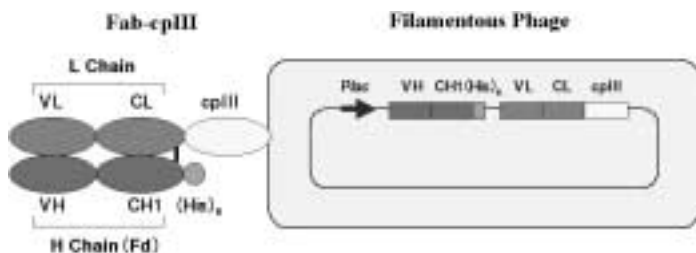


図3. ファージ抗体の模式図

M13ファージのような線状ファージを用いて粒子を構成するタンパク質(cpIIIを用いることが多い)と抗体(ここではFab型を例に示す。VH-リンカー-VLからなるsingle-chain Fv抗体が使われる)を融合させて抗体を発現させる。ファージゲノムが抗体遺伝子を有するので1個のファージが1個の抗体産生細胞に相当する。

は治療用抗体が全てヒト抗体として単離調製されることになるかと予想している。しかし一方で、そこまで一般化された方法にするには、未解決の技術が残っていると感じている。その点についてこの節で議論する。

抗原で免疫した後、動物体内で成熟抗体が作られるプロセスは実に優れている。これは変異の導入と親和力の高まった抗体産生細胞の選別がカップルしていることにより可能となる。in vitroでこのプロセスを再現するのは非常に困難である。(in vitroでは変異の導入とクローンの選別を別々に実施しなければならない。)そこでヒト抗体を作るトランスジェニックマウスを用いると、優れた性能の治療用抗体作製が可能に思える。しかし個体あたり 10^8 - 10^9 のBリンパ球から構成されるマウス免疫系が1000倍以上のBリンパ球を持つヒト免疫系をどの程度反映したものになるか、筆者は非常に興味を持っている。とりわけ抗体V領域の中で最も多様性の高いH鎖CDR3がマウスとヒトとは大いに異なる。D遺伝子の数と配列の多様性、更にN配列の平均鎖長も両者で大きく異なり、結果としてマウスでは多様性の程度はヒトと比べて低い⁸⁾。逆に言えば、マウスではCDR3の多様性を高めても結局それを生かし切れない。

既に記述したが、血清中に優れた性能の抗体が存在すれば抗体ライブラリー作製を通してモノクローン化できる。ヒトを対象とした場合に、抗体保有者がボランティアとして成分採血に協力してくれるとこれが可能となる。筆者らのグループでは血液3L相当(10^{10} 程度のリンパ球を含む)を得て、 10^{10} - 10^{11} の独立したクローンからなる抗体ライブラリーを作製して目的を達成している。この方法を広く用いようとした際に未だはっきりしていない点は、ウイルスや病原菌毒素に関してワクチン接種により誘導されてくる抗体と、実際に感染した結果作られる抗体が同質かどうかについてである。通常の感染では、抗原濃度が感染後次第に高くなり、抗体の出現と共にピークを過ぎて減少する。通常のワクチン接種では、最初から高濃度であり次第に減少する。免疫応答系の成立プロセスを考えた時に、全く同じレスポンスが起こる訳ではないと予想される。ウイルス生ワクチンが不活化ワクチンより有効な点もこのことの反映と推定される。

筆者の研究室では、数10名のボランティアのBリンパ球に富む組織(臍帯血、扁桃、骨髄、末梢血)から作製した巨大なヒト抗体ライブラリー(antibodies for intended multiple screeningを略してAIMSと名付けた)を利用して既に数多くの抗原に対する抗体を単離している。このような一つの巨大な抗体ライブラリーを、様々な抗原に対する抗体のマスターソースとして利用する方法についても各論の中で記述する。

治療用抗体単離(各論)

1. 感染症(ウイルス)

筆者らは、今までに水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、B型肝炎ウイルスの中和抗体単離を試みた。その経験に基づいてウイルス感染症に対する治療薬もしくは予防薬としての抗体単離法を論じる。ウイルスは宿主となる細胞と同じ細胞膜に取り囲まれてウイルス粒子を

形造っているものと、ウイルスゲノムにコードされたタンパク質からなる殻が剥きだしになってその中に核酸（DNAまたはRNA）を含むタイプがある。いずれの場合も、外皮に存在する特定のタンパク質 [インフルエンザウイルスではヘマグルチニン（HA）] が宿主細胞膜上の特定分子を受容体として結合することから感染が開始する。その後、ウイルスの種類によって幾つかの異なる感染経路が存在するが、最終的にウイルスゲノムが宿主細胞の細胞質内さらには核内まで到達して、ゲノムの複製が起こり、更にウイルスタンパク質が合成される。細胞内で増殖したウイルスは、ウイルス粒子として細胞外に放出されたのち、周囲の未感染細胞に再感染して拡散する場合と、粒子が細胞外に出ることなく細胞間での融合（syncytiaの形成）を通して感染拡大を実現するタイプがある。ウイルスに対して中和活性を示す抗体は、ウイルスが宿主細胞に感染する時に機能する上述したウイルス粒子外皮分子の特定部分（中和エピトープ）に結合する。ウイルス感染細胞が未感染細胞と融合する場合も、このウイルス由来分子は感染細胞膜上に発現しており、融合を仲介する。中和抗体は、このウイルス分子と受容体の結合を物理的に阻止する機能を示すことで、ウイルスの感染能を失わせる。1個のインフルエンザウイルス粒子上には1000個のHA分子が存在し、1ウイルス粒子あたり中和抗体が約30個結合するとウイルス感染が阻害される。抗体量と中和能の相関関係を解析すると、“one hit curve”（抗体濃度を2倍にすると、2倍のウイルスが失活する）が得られる。これらの古典的実験結果は、HA分子の中に約1/30の率でそこに抗体が結合するとウイルスの感染能を失うcriticalな部位があることを示唆しているが、ウイルス失活の詳細な分子機構は明らかにされていない。中和活性を示す抗体とHAの複合体の立体構造解析は、HA分子の中で受容体と結合する部分が中和エピトープであることを示しており、抗体がHAと受容体の結合を阻害することを示す。

VZV、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、いずれの場合もAIMSライブラリーから強力なウイルス中和活性を示す抗体が複数個得られた⁹⁾。詳細な解析をした結果、得られた抗体はヒト体内でウイルス中和抗体として機能した分子そのものであると判断された。AIMSライブラリーは数10名のヒトのBリンパ球由来であるが、この3種のウイルスは多くのヒトにとって感染経験があると予想され広く存在するものである。この研究結果を通して幾つかの点が明らかになった。1) 強いウイルス中和活性を示す抗体はウイルス粒子上または感染細胞膜上の分子に強く結合できるが、その分子を可溶化すると抗体との結合性が極端に弱まる。換言すれば、中和エピトープを有するウイルス分子の立体構造は、可溶化により壊れやすい。2) 抗体はH鎖とL鎖が一組となって抗原特異性が決まる。しかし抗体ライブラリーを作製する際には、多数のBリンパ細胞から集団のままmRNAを抽出し、H鎖およびL鎖はそれぞれ別々にライブラリー化したのちランダムに組み合わせて巨大ライブラリー化する。そこで抗体ライブラリーをスクリーニングしてもin vivoに存在した抗体を真に反映した組み合わせからなるものが得られない危惧があった。しかし、in vivoで成熟した抗体を産

生する細胞は相対的に増えていること（その結果、その成熟抗体をコードする遺伝子の転写物も相対的に多い）、L鎖レパートリーの大きさは数百種類程度と比較的小さいことから 10^{10} - 10^{11} のクローンからなるAIMSライブラリーからはin vivoで機能した抗体を単離できる（図4）。

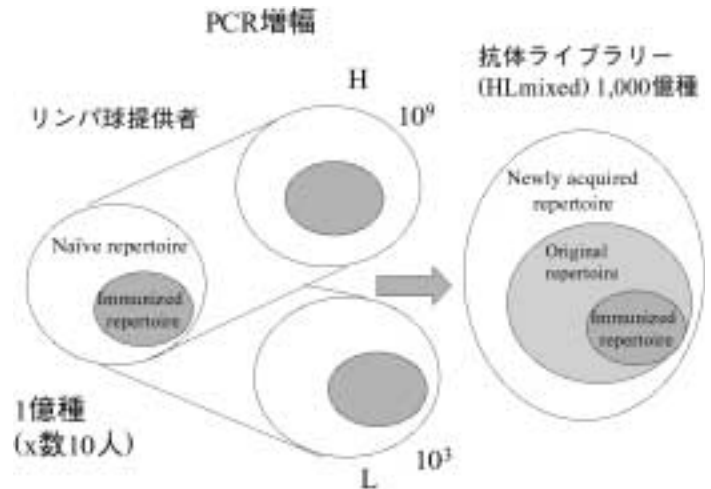


図4. 抗体レパートリーの相関関係
ヒト体内では抗体はナイーブレパートリーと成熟抗体レパートリーからなる。抗体ライブラリー作製に際しては、H鎖L鎖それぞれを別々に増幅させたのち、組み合わせて作製する。

単離したVZV中和抗体は、その中でもとりわけ中和力の強い2種類について臨床試験を開始できる段階にある(図5, 図6)。ロタウイルスの場合は、幾つかの型が存在するが、中和可能な型の異なる3種類の抗体を混合することで殆ど全ての型のウイルスを中和できる。共同研究者である谷口のグループは、動物実験で経口投与することにより大腸性下痢を予防できることを示した。インフルエンザウイルスに関しては、毎年のように起

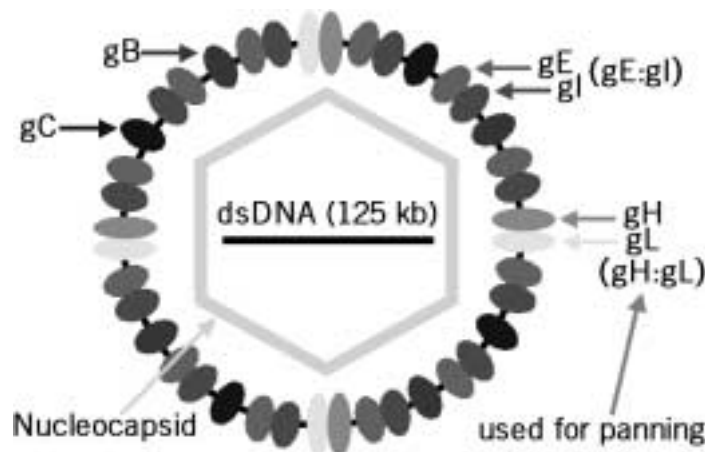


図5. VZV粒子の構造
VZV中和抗体単離に際しては、表面タンパク質であるgH:gL複合体を抗原として用いた。

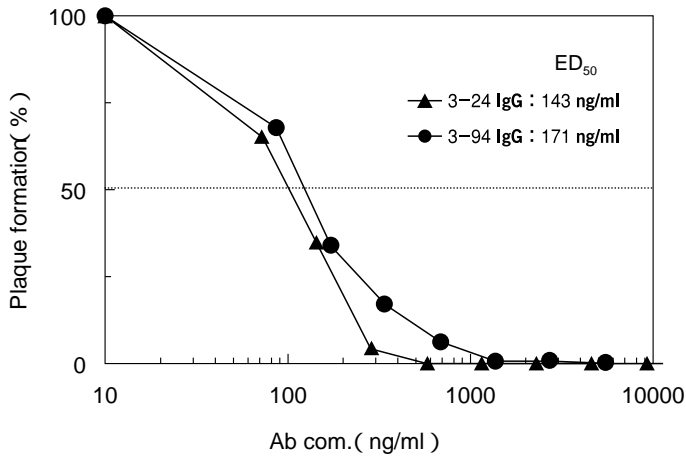


図6. VZV中和抗体のウイルス中和力
3-24, 3-94 IgG型抗体は、非常に強い中和力を示す。

この抗原性の変化(antigen-drift)の問題があり、単離した抗体も種特異性(strain-specificity)が高い。そこで抗体を治療薬として開発するには、中和可能な範囲がなるべく広い抗体単離のための工夫が必要となる。B型肝炎ウイルスに関しては、筆者のグループでは未だ中和活性を示す抗体単離に成功していない。

2. 病原菌毒素

病原菌毒素に関して、ジフテリア毒素(DT)、破傷風毒素(TT)、ボツリヌス毒素に対する中和抗体単離を試みた。DT, TTは百日咳毒素(PT)と共に日本人では幼児期に3種混合ワクチン接種を受けている人が多く、AIMSライブラリーの中に中和抗体が含まれていることが予想された。その期待通り、DTおよびTTに対して強く結合する抗体が多数単離された。単離された抗体はそのアミノ酸配列に基づき分類できる。とりわけH鎖CDR3の塩基配列が完全に一致する、もしくはわずかの変異導入で説明できる関係にある場合は、同一人物由来で更に1個の抗体産生細胞が増殖し、変更を導入された産物と推定できる。DT, TTそしてインフルエンザウイルスの核タンパク質(NP)に対して得られた抗体集団について、次のような共通点が観察された。それぞれ明らかに特定の数のBリンパ球由来の抗体で、様々な異なる部位数個に変異が導入されると推定される多数の抗体集団が得られた。DT, TTの場合、その抗体の抗原結合力は極めて強い($K_d=0.1-1nM$)。DTに関しては、Vero細胞を用いて毒素の細胞への吸着、侵入、酵素活性のどの段階を抗体が阻止するか解析すると、吸着を阻止することが示された。更にウマ血清やヒト血清(両方ともポリクローン抗体)の毒素中和抗体価測定系を用いて解析したところ充分強い中和活性を示すクローンが含まれていた。上述したウイルス中和抗体の場合は、得られた多種類の中和抗体を相互比較してみても変異導入で説明できる単一Bリンパ球由来と考えられる組み合わせの抗体は得られていない。そこでDT, TT, NPに対する抗体の性質(中和活性を示すものと示さないもの両方が共存している)は、複数回(DTPワクチンでは通常4回)のワク

チン接種により産生が誘導された抗体の特徴ではないかと推定している。ウイルスが感染した場合は、中和力の強い抗体を産生できるようになった少数の細胞が選別されるしくみがある。トキシドワクチン(NPはインフルエンザワクチンに大量に含まれていることから同じ現象が起こった)を何回か接種すると、抗毒素抗体産生が誘導されその結合力は高まる(成熟した抗体が出現する)が、中和活性の強弱による特定のクローンの選別が働かない。将来的に毒素中和薬としてモノクローン抗体を用いる場合に、本来ポリクローン抗体である抗血清の力価測定系をそのままモノクローン抗体検定に用いてよいか、今後の検討課題である。ウマ抗血清で用いられている力価をモノクローン抗体で達成しようとするグラム単位で患者に用いることになる。経験的に $K_d=0.1-1nM$ より強い結合力を示す抗体は通常期待できない。AIMSライブラリーをスクリーニングする際に、トキシド(ワクチンとして用いるためにトキシンをホルマリン処理して無毒化したもの)でなくトキシンを抗原に実施したが得られる抗体の性質に大差なかった。

ボツリヌス毒素に対する中和抗体単離も筆者のグループで成功しているが、その詳細は解析中である。

3. ヘビ毒

ハブやマムシのような毒を持つヘビに咬まれた場合、従来より抗毒素抗体を高濃度に有するウマ血清を治療に用いている。ウマ血清は特効薬であるがアナフィラキシーショックを含めた様々な副作用が問題となり、ヒト抗体に変更したいという強い医学的要請がある。そこで筆者らは抗ハブ毒中和抗体単離を試みることにした。ヘビ毒は多成分からなる混合物であるが、ハブの場合は出血因子(HR-1, HR-2)が同定、精製されているので最初の標的として抗HR-1, 抗HR-2抗体単離を試みた。最初AIMSライブラリーを用いたが、得られたHR-1とHR-2に結合する抗体は弱い結合力を示すが毒素中和活性を持たなかった。共同研究者である野崎博士が、「長年にわたってハブを飼育しハブ毒の抽出精製を担当している人(この人は生涯で5回ハブにかまれている)を紹介しましょう。その人が成分献血(リンパ球画分)をしてくれるので、それを材料にして抗体ライブラリーを作製してはどうか」と提案された。このアイデアは素晴らしかった。あるヒトの血清中に特定の抗原に対する抗体が含まれていることが判明した場合に、その抗体を産生している細胞を確実に回収する方法はこれまで確立していなかった。その細胞が体内のどの部分に存在するか定かでない。しかし成分採血という手段をとると、全身に散在するBリンパ球全てのレパートリーを反映した多数の細胞を得ることが可能で、その中には目的とする細胞が確実に含まれている。作製したライブラリーの中には抗HR-1抗体, 抗HR-2抗体, 更には様々なハブ毒に含まれる成分に対する抗体が含まれていた。そして抗HR-1抗体は、強い毒素(出血)中和活性を示した。この抗体は臨床試験を開始すべき段階にある。この研究により、特定の性質をした抗体を有する人がボランティアとして成分採血に協力してくれるなら、その抗体をモノクローン化する技術が確立した。

4. 癌

筆者の研究室では、厚生労働省研究費に支えられて以上のような様々な感染症に対する中和抗体を単離するプロジェクトを実施した(している)。同時に、平成11年度から5年間、文部科学省科学技術振興調整費によるゲノムフロンティア開拓研究として「ポストゲノム時代のタンパク質機能解析ツールとして抗体を利用する方法の開発」を行った。そのプロジェクトの中で線虫(C.elegans)母系遺伝子約800種の発現パターンをタンパク質レベルで解析する試薬として抗体を調製した。ゲノムサイエンスは、多数の対象を網羅的に扱うことを特徴とする。このプロジェクトを立案した頃には、AIMSライブラリーにどのような抗原に対しても特異的に結合する抗体が必ず含まれていると確信していた。そこで多数の抗原に対してAIMSライブラリーを抗体のマスターソースとして用いることにより、一網打尽に抗体を単離できると予想した。研究を続ける中でこの考えの甘さ(抗体ライブラリーの中に目的とする抗体が含まれることと、それを単離できることは別問題である)が明らかになったが、解決法を模索する中で新しい展望が開けた。

抗原を用いて動物を免疫すると、その動物の中に出現する抗体は、免疫応答成立過程で起こる様々な現象の産物である。例えば抗原はアジュバンドと共に免疫する、小分子(ハプテン)はタンパク質(キャリアー)に結合させる必要がある、体内に導入された分子は、様々なプロセッシングを受ける等。それと比較して特定抗原を用いて抗体ライブラリーをスクリーニングする操作は抗体が得られる原理が全く異なる。ファージ粒子上に存在する抗体が用いた抗原と物理的に抗原抗体複合体を作り、洗浄プロセス(複合体を作らなかったファージや、非特異吸着したファージを除くために必要)でその複合体が破壊されなかったファージ粒子(抗原抗体反応は平衡反応であるので、複合体形成反応と解離反応が同時に起こっている。洗浄すると解離反応のみが起こり続けることになる)のみを回収することができる。この単純な事実に気付くのに長期間の悪戦苦闘を必要とした。上述したVZVの例では、精製抗原(gH:gL複合体)を用いてAIMSライブラリーをスクリーニングして得た中和抗体がELISAでは弱い結合力しか示さないのに、その抗体の単離に成功した。一方、ELISAでは強い結合力を示す抗体がウイルス中和活性を示さなかった。何故このようなことが起こったかを推定すると、AIMSライブラリーの中にVZV中和抗体が多数存在したからである。スクリーニングに用いるパニング法とELISAは、本質的に同じ原理に基づいておりプラスチック表面に抗原を付着させてその後抗原-ファージ抗体複合体を作らせる。中和活性を示さないがELISAで強い結合力を示す抗体が多数存在するとすれば、それらのみが得られたはずである。このような研究の紆余曲折の中で、ファージ抗体ライブラリーを上手に利用する上で最も重要な点に気付いた。「ファージ抗体ライブラリーは、単離した抗体を使用する時点で対象とする抗原が形作っているであろう立体構造をそのまま反映した抗原を用いてスクリーニングするのが、使用目的に合致した性質の抗体を得る上で最適である。」「抗原抗体反応は平衡反応である。

AIMSライブラリーは、どのような抗原分子に対する抗体もほぼ確実に含んでいる。そこで抗原とファージ粒子集団を混合すれば、一定頻度で必ず複合体ができているはずで、スクリーニング法として洗浄プロセス(複合体が破壊される段階)を経ることなく複合体を単離する方法を開発しよう。」

in vivo抗体レパートリーに二重性があることは上述したが、AIMSライブラリーはそれを反映した抗体レパートリーの構成になっている。多くの人が感染-発病-治癒の経験があると予想される疾病に対する中和抗体単離の成功例は既に記述したが、残りの大部分のナイーブレパートリーを構成する抗体の利用法が問題であった。ゲノムプロジェクトとして多数の抗原に対する抗体のソースとして用いる試みは、調製した抗原がナチュラルな立体構造をしていないことがネックとなって挫折した。治療用抗体の対象となり得る疾患を想定してみる。薬剤として体内に投与された抗体は、通常の状態では分泌分子もしくは細胞膜上に発現した分子に結合する。そこでサイトカインやそのレセプターまたは癌特異抗原が治療用抗体の標的と考えられ、現在、開発が進められている。そこで筆者らは発想を大転換し、特定の既知抗原を標的として抗体を単離するのではなく、標的抗原を捜すために抗体ライブラリーを用いるという考えに到達した。より具体的には、癌細胞膜上に存在する事実上全ての分子(エピトープ)に対する抗体を網羅的に単離する。続いてその抗体を用いた組織染色により癌細胞特異的な染色パターンを示す抗体を探し出す。抗体を用いた免疫沈降(IP)またはアフィニティクロマトグラフィーにより抗原を精製し、マスマスペクトロメーター解析によりその抗原を同定するというのが基本戦略である。このアイデアの最も根幹をなす「細胞膜上の全てのエピトープに対する抗体を単離する技術開発(図7にスキームを示す)」にほぼ2年前(平成14年秋)に成功した。

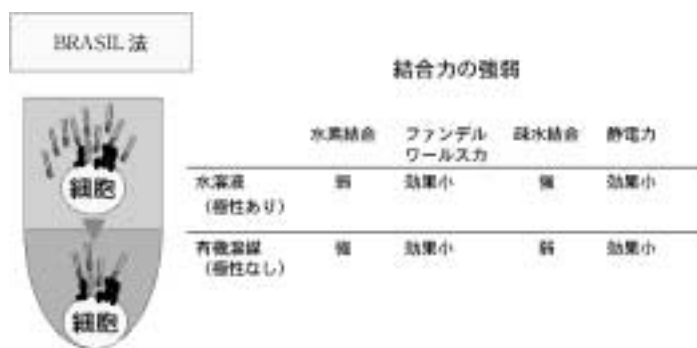


図7. 細胞上の抗原に対する抗体を網羅的に単離する原理
水溶液中で細胞と抗体ファージを混合し、遠心法によって抗原抗体複合体を細胞と共に有機溶媒層下に沈殿させる。水溶液の環境から有機溶媒への変換で水素結合が強まり、多数の抗体を洗浄過程を経ることなく回収できる。

癌治療用抗体はハーセプチンとリツキサン成功例があり、開発の参考となる。最初、肺癌および乳癌でHer2遺伝子を含むDNAが増幅していることが発見され、Her2遺伝子の異常大

量発現が発癌の原因であることが示された。このHer2タンパク質を標的とするヒト化抗体がハーセプチンである。Bリンパ細胞は全てCD20分子を発現している。リツキサンは抗CD20マウス/ヒトキメラ抗体であり、非ホジキン型Bリンパ腫の治療薬として使われるリツキサンは、腫瘍細胞のみを殺す訳ではなく、正常B細胞を含めた全てのCD20発現細胞が殺される。しかし、治療後正常Bリンパ細胞は、造血幹細胞の分化によって再生するので治療中の感染症対策を充分に行えば副作用の問題は解決できる。この2例に示されるように従来型の創薬コンセプトは、標的探索がそれまで知られた事実に基づき論理的である。しかしゲノムサイエンスがもたらした膨大な情報量に基づくゲノム創薬が抗体分野に持ち込まれた。

典型的なアプローチが、基本的にヒト全遺伝子を解析できるDNAマイクロアレイを用いた転写物の網羅的解析法で、癌細胞由来のmRNAと正常細胞由来のmRNAを対象に、質的または量的差を示す遺伝子を見出す方法である。データの多くは公表されていないが、間違いなく世界中で多くのグループが試みており莫大なデータが蓄積されていると推定される。そしてその中から各癌ごとに10数種を越える癌特異抗原が抗体標的候補として挙げられているであろう。

筆者の研究グループでは全く別のアプローチをとっている。肝癌を例にすれば、様々な肝癌由来細胞を抗原にして既に2000種を越える細胞膜上分子に結合するモノクローン抗体を単離した。それをプローブにして手術除去した肝癌組織の切片を用いた組織染色を行い、八百数十例の抗体の中で数10種類が癌組織特異的染色像を与えることを見出している(図8)。その中で癌治療用抗体の候補となり得る条件は、(1)抗体によって認識される抗原が、何故癌特異抗原となっているか、質的および量的視点から説明できる、(2)IgG化した抗体が、標的抗原を発現する癌細胞に対してADCC[antibody-dependent cell cytotoxicity:細胞膜上で抗原抗体複合体が形成されると、ナチュラルキラー(NK細胞)等がそれを認識して細胞を殺す因

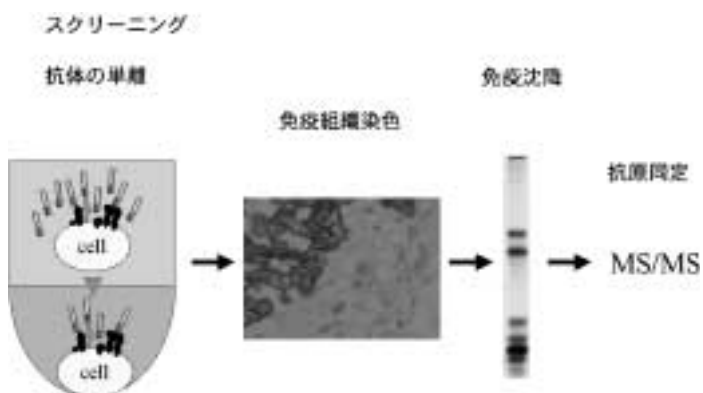


図8. 癌特異抗原の同定と癌治療用抗体単離の方法

1) 癌細胞を抗原にして膜タンパクに対する多数のモノクローン抗体を単離する。2) 手術除去した癌細胞に対する免疫組織染色で癌特異的染色像を与える抗体を選別する。3) 抗体を用いた免疫沈降で、抗原を分離する。4) マススペクトロメーターによる解析で癌特異抗原を同定する。

子を分泌する]による致死効果を示す、(3)手術除去した癌細胞のヌードマウス(またはSCIDマウス)中での増殖をIgG抗体が抑制する。

DNAマイクロアレイを用いたアプローチおよび筆者のグループのアプローチを遂行する中で抱えている現段階での最大の問題は、候補となり得る抗原数もしくは抗体数が多すぎてIgG化が追いつかない点である。更に動物を用いたモデル実験を前臨床試験と位置づけるとすれば、ヒトを対象とする臨床試験実施には、1抗体についてGMPおよびGCPレベルで必要量調製するのに最低2-3億円必要と推定されており、この問題を如何に乗り越えるか道を見出さないと「宝の持ち腐れ」となってしまう。

以上の2方向からの網羅的アプローチが癌治療用抗体単離に結びつくとなれば、癌に対する抗体を用いたテーラーメイド医療が現実のものとなる。その場合最大の問題は、抗体調製に要する莫大な費用をどうするかとなり、安価な抗体調製法の開発が求められている。

抗体治療薬開発可能分野

1. 自己免疫疾患

TNF に対する抗体(レミケード)が、関節リウマチに劇的な治療効果をもたらすことが示されている。サイトカインは数多く同定されているが、ネットワークを作っており、その最上流に位置するTNF やIL-1の働きを抑制するとその下流にある多くのサイトカインの働きも抑制され、免疫系の異常亢進が原因である自己免疫疾患に治療効果をもたらすと考えられている。ここで議論しようとするのは、そのような原理に基づく抗体治療薬ではなく、自己抗原に対する抗体の出現が発病の原因と推定されているが、その抗原の実態がわからない各種自己免疫疾患に関してである。例えば、「高安動脈炎」等の血管炎は、血管内皮細胞の特定分子に対する抗体の出現が原因である可能性が高い。「川崎病」では グロブリン大量投与により冠動脈瘤の形成を阻止できるが、その際 グロブリンの中の何かが特定抗原の機能を抑制しているかもしれない。ヒトゲノムシーケンスが完了し、全ヒト遺伝子総数が予想以上に少ない(2万2万5千)ことが判明した。細胞膜タンパク質がそのうちの20%としても4-5千種となる。筆者らの研究グループではこの全膜タンパク質に対するモノクローン抗体単離が現実的に可能な課題であると考えている。その抗体をセットとして準備し抗体チップを作製すれば、今まで未同定だった様々な抗原もしくは自己抗体を結果として単離できる。今後難治性疾患として患者数の増大が予想される自己免疫疾患の治療法の道を開くと推定している。

2. 神経変性疾患

アルツハイマー病、クロイツフェルトヤコブ病、更にハンチントン病を代表とするポリグルタミンを原因とする各種神経変性症は、全てタンパク質凝集体の形成と神経細胞死が密接に関係(一部因果関係も示されている)する病気と推定されており、

現在治療法が存在しない。動物実験レベルではこの凝集体形成を阻害する抗体投与またはその抗体産生を誘導するワクチンに治療効果があることが報告されている。本格的に抗体治療が行われるのは遠い将来と思われるが、抗体開発の対象疾患として巨大ジャンルである。

展望

本総説は7年余にわたって各種疾患治療薬としてのヒト抗体単離を実施した筆者が、現時点(平成16年秋)で考えるこの分野の概観である。薬は、小分子からなり経口投薬可能なものにより望まれる。注射を必要とし高価な抗体が長期に渡って薬の主役となるとは想像し難いが、今後10-20年間、創薬の重要な一角を占めるのは間違いない。本小文では、筆者らのグループで用いているファージ抗体ライブラリーを基本技術としたヒト抗体単離調製戦略を中心に論じているが、その技術的詳細は書いていない。技術的なことについては既に幾つも実験書が出版されている。ファージ抗体ライブラリー作製には基本特許が存在し、その特許料が高額に設定されていること、一方で大学院生を研究グループの核とする小グループがアカデミック研究を進める技術としては多くの単純労働を必要とする点から向いていない、等の理由でその高いポテンシャルと比較して技術的発展が遅れた分野である。筆者のグループでは10数名の人が数年にわたって本プロジェクトに取り組み、本文で記述したような結論に到達した。詳細に読んで頂くと、何が問題であり如何なる点を考慮すべきかご理解頂けると思う。筆者はCAT社の特許が終了した後は、ファージディスプレイ技術を用いる研究者が飛躍的に増加し、ゆくゆくは現在の細胞融合技術を凌駕すると確信している。本文がファージ抗体ライブラリーの可能性を正しく予言したものであれば幸いである。

謝辞

本総説は藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学研究部門で実施されている「抗体プロジェクト」の成果に基づいて書かれているが、多くの共同研究者の協力による。AIMSライブラリーは赤堀泰、伊庭善孝、森野和彦、篠原みどりの4名が作製した。VZV中和抗体単離は富山医科薬科大学医学部・白木公康教授との共同研究で、鈴木和宏、赤堀泰が担当した。ロタウイルス中和抗体単離は本学谷口孝喜教授との共同研究でウイルス学教室の守口匡子が実施した。ジフテリア毒素および破傷風毒素の中和抗体単離は国立感染症研究所の高橋元秀博士との共同研究で柿田麻衣が担当した。ボツリヌス毒素中和抗体単離は同じく高橋元秀博士との共同研究で東成見が担当している。インフルエンザウイルス中和抗体単離は大阪公衆衛生研究所・奥野良信教授との共同研究で廣野ゆかり、岡田潤が担当している。ハブ毒中和抗体単離は沖縄衛生研究所の野崎真敏博士との共同研究で東成見が担当している。抗癌抗体研究は本学医学部消化器外科の杉岡篤助教授、森田美和研究員と我々のグループとの共同研究として開始し、現在は以下のメンバーが参加している。医学部(杉岡篤、森田美和、宮川秀一、星長清隆、白木良一、

溝口良順、加藤良一)、黒澤研究室(赤堀泰、伊庭善孝、濱田進、黒澤仁)、COE関係(住友万里子、村松千穂、松田一起、江口恵子)。自己免疫疾患については本学吉田俊治教授との共同研究で、三浦恵二、玉熊桂子が担当している。このように多数のメンバー参加による巨大プロジェクトとして実施されている。更に本研究は、プロジェクト開始当初から(株)医学微生物学研究所(MBL; 数納幸子会長、西田克彦社長)の全面的支援を受け、平成11年5月には治療用ヒト抗体開発を目的としたベンチャー会社、(株)抗体研究所(IFA)がMBLの子会社として設立された。現在9名の研究者がIFAに所属して黒澤研究室で共同研究を実施している。

引用文献

1. Koehler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-497.
2. Kameyama K, Imai K, Ito T, Taniguchi M, Miura K, Kurosawa Y. Convenient plasmid vector for construction of chimeric mouse/human antibodies. *FEBS Lett* 1989; 244:301-306.
3. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185 HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:4285-4295.
4. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-581.
5. Karpus A, Dremucheva A, Czepulkowski BH. A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001;98: 1799-1804.
6. Medez MJ, Green LL, Corvalan JRF, Jia XC, Maynard-Currie CE, Yang XD, Gallo ML, Louie DM, Frickson KL, Luna J, Ray CMN, Abderrahim H, Kirshenbaum F, Noguchi M, Smith DH, Fukushima A, Hales JF, Finer MH, Davis CG, Zsebo KM, Jabovits A. Functional transcript of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nature Genet* 1997;15: 146-156.
7. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenbom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 1994;12:433-455.
8. Ichihara Y, Matsuoka H, Kurosawa K. Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. *EMBO J.* 1988;7:4141-4150.
9. Higo-Moriguchi, K, Akahori Y, Iba Y, Kurosawa Y, Taniguchi K. Isolation of human monoclonal antibodies that neutralize human rotavirus. *J. Virol.* 2004;78:3325-3332.

血清アルブミンの構造特性と医薬への応用

Structural Properties and Pharmaceutical Application of Human Serum Albumin

安楽 誠⁽¹⁾, 丸山 徹^(1,2), 小田切 優樹⁽¹⁾

Makoto Anraku, Toru Maruyama, Masaki Otagiri

和文抄録

ヒト血清アルブミン(HSA)は、膠質浸透圧の維持、薬物結合能、抗酸化能など生体内の恒常性維持に必要不可欠な機能を数多く有していることから、各種病態時に伴う血中HSAの量的・質的変動は、これらの機能低下を引き起こす。最近、部位特異的変異法によりHSAの機能発現に必須なアミノ酸残基が同定され、特に、薬物結合や抗酸化能に重要な残基が明らかにされつつある。また、HSAは、安全性、生体適合性や血中滞留性に富んでいるため、ドラッグデリバリーシステム(DDS)における担体としての開発も盛んに行われており、遺伝子組換え技術によるアルブミンと蛋白性医薬品の遺伝子を融合させたアルブミン融合医薬品をはじめ、アルブミンの断片化、多量体化によるサイズ調節など、アルブミン自身の改良による医療への応用も試みられている。特に、HSAの高いリガンド結合性を利用したアルブミン循環透析は、肝機能補助療法として利用されている。

Abstract

Human serum albumin(HSA) has many essential functions for homeostasis, such as the maintenance of osmotic pressure, drug binding capacity and antioxidant activity. In some diseases, the qualitative and quantitative variation of HSA in blood induced the depression of these functions. Site-directed mutagenesis studies of HSA, made it possible to examine the participation of various amino acids residues in the functional properties of HSA, such as binding capacity and antioxidant activity. In addition, the development of HSA as carrier in the drug delivery system(DDS) is advanced, such as albumin fusion protein and fragment and polymeric albumin by using recombinant DNA technology. Especially, albumin circulation dialysis using the high ligand binding capacity of HSA will be utilized as liver function adjuvant therapy.

Keywords

Human serum albumin, X-ray crystallographic analysis, site-directed mutagenesis, pharmaceutical application, albumin circulation dialysis

はじめに

HSAは、血漿蛋白質のなかでも最も高濃度(約4g/dL)に存在し、生体内において血漿膠質浸透圧の調節(正常血漿の膠質浸透圧のうち、80%がアルブミンによって維持されている)、脂肪酸、ビリルビン、尿毒症物質、一酸化窒素をはじめとする内因性及び薬物などの外因性リガンドの輸送担体、抗酸化能など数多くの機能を有している¹⁴⁾。種々の病態・疾患時では、ア

ルブミンの質的・量的変動が認められ、膠質浸透圧の低下による浮腫の発現、血中薬物濃度増大による副作用の発現、抗酸化能の減少など生体内恒常性の異常を来す。

ところで、このようなマルチな機能を持つHSAは、優れた生体適合性に加えて非常に長い半減期(生物学的半減期:15~19日)を持つため、低分子のみでなく、薬物動態学的特性に問題がある生理活性ポリペプチドにおいても好ましい担体として利

(1) 熊本大学大学院医学薬学研究部 〒862-0973 熊本市大江本町5-1 Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan

(2) ファーマダイワグループ・学術部 Pharma Diwa Corporation

論文受付 2004年12月28日 論文受理 2005年2月7日

用されてきた。さらに、最近、遺伝子組換え技術によるHSAを用いたDDSの開発研究は、アルブミンと蛋白性医薬品の遺伝子を融合させたアルブミン融合医薬品をはじめ、アルブミンの断片化、多量体化によるサイズ調節など、アルブミン自身の改良による医療への応用も試みられている。

本稿では、X線結晶構造解析並びに化学修飾等の結果を基に、HSA分子上の薬物結合サイトを始めた機能発現に必須なアミノ酸残基に着目し、遺伝子組み換え技術を用いたHSAの機能に及ぼすそれらアミノ酸残基の役割について紹介する。加えて、ドラッグデリバリーシステム(DDS)担体として利用されているHSAについて、遺伝子組換え技術を応用したHSAの医療への新たな展開について述べる。

1. HSAの機能発現に係るアミノ酸残基

HSAは585個のアミノ酸残基から成る分子量約66.5kDaの糖鎖を持たない単純蛋白質である。HSAの基本構造はヘリックスとそれを結ぶ柔軟なhinge領域より形成される3つのドメインである(ドメインI, II, III)が、水溶液中ではこれら3つのドメインがさらに折り重なって、心臓の様な形状をした特有の立体構造をとっている(Fig. 1)。また、HSAはその分子中に35個のシステイン残基(Cys)を有しているが、そのうち17対は分子内ジスルフィド結合を形成し、9つのループの構築やHSAの構造安定化に大きく寄与している。一方、一次配列上34番目のCysはSH基が唯一遊離な状態で存在しており、このSH基が抗酸化能やリガンド輸送といったHSAの特有な機能発現において重要な役割を果たしている。



Fig. 1. Crystal structure of human serum albumin. (HSA) (from Ref. 1)

³⁴Cys (サブドメインIA)

³⁴Cysは遊離の反応性の高いSH基を有しており、これが血中におけるラジカルやある種の薬物のスカベンジャーあるいはリザーバーとして機能している。Bhagavanらは、Cys-Ser変異体を作製し、NO消去能が約60%に低下したことから、³⁴Cysを抗酸化アミノ酸残基として定義している⁵⁾。また、Eraらは、³⁴CysのSH基に着目し、SH基がフリーの状態を還元型アルブミン(メルカプトアルブミン:HMA)、シスチンや酸化型グルタチオンなどの含硫アミノ酸とジスルフィド結合した状態を酸化型アルブミンとし、血中において、これら両者が混合物として

存在することを報告している⁶⁾。この³⁴Cysの還元型と酸化型アルブミンの割合はHPLC法により、簡便に定量できることから、これまでに腎疾患、肝疾患など種々の疾患における生体内の酸化還元動態の解析に用いられている⁷⁾。最近、著者らもまた、このカラムにより腎透析患者に貧血を防ぐために併用投与されている鉄剤による生体の酸化亢進を確認している(Fig. 2)⁸⁾。このように細胞内では多量の還元型グルタチオンの存在によってかなりの還元性が保たれているが、一方細胞外では、血管内外を問わず体内に多量に存在する血清アルブミンがこのSH基の酸化・還元機構によって、非酵素的な抗酸化蛋白質として広く機能している。事実、Evancoらは、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)の患者に対して、20%アルブミンを投与した結果、非投与群に比べて生存率が30%上昇するとともに、血中のチオールレベルが回復したことから、³⁴CysのSH基が血清中における抗酸化アミノ酸残基として機能する可能性を示唆している⁹⁾。

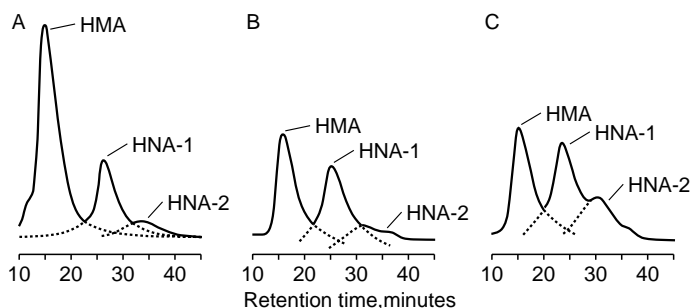


Fig. 2. High-performance liquid chromatography (HPLC) profile of serum albumin from hemodialysis patients (HD) patients with or without intravenous iron administration (IVIR) 5 μ L aliquots of serum from HD patients with or without IVIR, and healthy subjects were subjected to HPLC analysis using a Shodex Asahipak ES-502N column. A representative tracing of HPLC profiles of serum albumin from normal subjects (A) A representative tracing of HPLC profiles of serum albumin from HD patients without IVIR (B) A representative tracing of HPLC profile of serum albumin from patients treated with IVIR (C) HMA; mercapto albumin, HNA-1 nonmercapto albumin (S-S) HNA-2; nonmercapto albumin (-SOOH or -SOOH) (from Ref. 8)

Met残基 (¹²³Met, ⁵⁴⁸Met)

これまでに³⁴Cysの重要性を示してきたが、当然、その他のアミノ酸残基も修飾を受ける。特に、Metの酸化は、³⁴Cysにつぐ酸化ストレスに対する必須残基として位置づけられている。事実、Finchらは、³⁴Cysの抗酸化能には及ばないものの、¹²³Met, ⁵⁴⁸Metが活性酸素である過酸化水素の標的部位であることを明らかにしている¹⁰⁾。著者らもまた、Met-Ala変異体を用いた検討より、¹²³Met, ⁵⁴⁸MetがHSA自身の酸化に対して抗酸化剤として機能することを見出し、この結果の妥当性を裏付けている。また、アルブミンの事例ではないものの、Metの重要性を示す例として、肺水腫による α -アンチトリプシン欠損症において、Metの酸化が蛋白自身の機能消失を引き起こすことが報告されている。加えて、Stadtmanらは、抗酸化能を有す

るMetがグルタミン合成酵素の活性サイトの入り口に位置していることに注目し、活性サイトにおいて機能発現や構造維持に重要なアミノ酸残基をラジカルによるダメージから守るスカベンジャーとしてMet残基が機能している可能性を示している¹¹⁾。好都合なことには、Metの酸化体であるメチオンスルフォキシド(MSOX)は細胞内に存在するMSOX還元酵素により元のMetへ変換される¹²⁾。したがって、Metは細胞内ではこのサイクルにより半永久的に抗酸化剤として働くことも可能である。

サイト 1 に位置する残基 (¹⁹⁹Lys, ²¹⁴Trp, ²¹⁸Arg, ²⁴²His)

サイト 1 へは、ワルファリン、フェニトイン、フロセミド及びグリベンクラミドをはじめとする多くの薬物が結合する。このサイト 1 は一次配列における¹⁹⁹Lys~²⁹²Gluに存在しており、²¹⁴Trpなどの疎水性アミノ酸残基からなる疎水領域に²⁴²Hisおよび¹⁹⁹Lysといった陽電荷が局在している。事実、作製したHSA変異体を用いた検討結果から、¹⁹⁹Lys, ²¹⁴Trp, ²⁴²Hisのいずれもが薬物結合に深く係りわり合っていることを確認している¹³⁾。また、²¹⁴Trpは、HSA分子上、中心に位置することから、構造維持に必須なアミノ酸残基として機能している。加えて、Bhagavanらは、²¹⁴Trp Ala変異体を作製し、抗酸化能が約70%に低下したことから、²¹⁴Trpを抗酸化アミノ酸残基として定義している⁵⁾。最近、Trpの結合特性を活用してHSA製剤に大量に添加されているN-Acetyl-Trpが、抗酸化剤として機能していることが報告された¹⁴⁾。すなわち、²¹⁴Trpは、HSAの構造と機能を担う必須なアミノ酸残基として役割を果たしていると考えられる。また、家族性高チロキシン血症(FDH)はチロキシンの血中濃度が通常よりも著しく高い疾患であるが、この原因として²¹⁸ArgのHisへの変異が明らかにされている。事実、Bhagavanらは²¹⁸ArgのHisへの変異体を用いてチロキシンの結合性が約65倍増加することを見出している¹⁵⁾。

サイト 2 に位置する残基 (⁴¹⁰Arg, ⁴¹¹Tyr)

著者らはケトプロフェンを用いた光親和性ラベル化法に加えて、部位特異的変異法を用いた実験結果から、サイト 2 に対する薬物結合には⁴¹⁰Argのグアニジノ基に加え、⁴¹¹Tyrの水酸基とその芳香環も重要な役割を果たしていることを明らかにしている¹⁶⁾。さらに、このサイト2へは経腸栄養剤や脂肪乳剤に含まれる中鎖脂肪酸も強く結合しHSAの構造安定性を向上させることが知られている。この特性を活用してHSA製剤にはC₈のカプリル酸が安定化剤として大量に添加されている¹⁴⁾。サイト 2 は上述した薬物結合能に加え、エステラーゼ様作用を有する。著者らは⁴¹⁰Arg Ala変異体、⁴¹¹Tyr Ala変異体あるいは両者の二重変異体を用いた実験結果から、この酵素反応の活性中心が⁴¹¹Tyrの水酸基であることとともに、⁴¹⁰Argがその反応性を高めていることを見出している¹⁷⁾。また、菊川らは、*in vitro*においてウシ血清アルブミン(BSA)を過酸化水素により処理後、血中セリンプロテアーゼである酸化蛋白質分解酵素により、この酸化BSAを処理したところ、BSAの⁴⁰⁹Arg-⁴¹⁰Tyr-⁴¹¹Thr近傍を特異的に切断することを報告している¹⁸⁾。この結果を受けて、

著者らは、BSAの切断部位に相当するHSAの⁴¹⁰Arg Ala, ⁴¹¹Tyr Ala変異体を用い、その体内動態をwild-typeと比較検討した結果、⁴¹⁰Argの変異体においてのみ素早い消失を確認している。すなわち、変異による⁴¹⁰Arg近傍のコンフォメーション変化が血中の酵素により切断された結果、消失の促進を引き起こしている可能性が考えられる。

2. 遺伝子組換え型HSAを利用した医薬への応用

従来、HSAは生体分解性や血中滞留性に富んでいるため、動態特性上問題がある薬物のDDSにおいて好ましい担体として用いられてきた。高分子医薬に対し、アルブミンを担体として付与する場合、アルブミンが有するリガンド結合能を利用した非共有結合、あるいは両者を化学修飾によるいずれかの方法が用いられてきた。しかしながら、化学結合の場合、均一な結合体の調製が難しい上、両成分の生理活性や特性を保持させるためには、適切な架橋条件を見出す必要があるなどの問題点が指摘されている。最近、このような問題点を克服するため、アルブミンと蛋白性医薬品の遺伝子を融合させたfusion-proteinの開発が盛んに行われている。さらに、臓器指向性や、主薬の安定化向上を狙ったHSA自身のサイズ調節をはじめ、新規蛋白医薬品としてのアルブミンの医療への応用も試みられている。

1) チオール基(³⁴Cys)を利用した医薬への応用

一酸化窒素との相互作用

一酸化窒素(NO)やカプトプリル、プシラミンといったSH含有薬物は³⁴Cysに共有結合する。特に、血管弛緩因子であるNOは血液中でS-ニトロソ蛋白として運搬され、その8割がS-ニトロソHSAとして存在している^{19,20)}。S-ニトロソHSAになると、血管平滑筋を弛緩させたり、血小板凝集を抑制したり、アデニール・サイクレースを活性化させたりする。一酸化窒素(NO)が新しい生理活性物質として認識され、生体内NO結合メディエーター蛋白として、ヘモグロビン(Hb)やHSAがその対象として研究されている。虚血性疾患や臓器移植時などの病態時では、内因性のNO産生低下に伴い外因的なNOの補充が必要不可欠であることから、比較的長寿命で安定な新規NO補充療法の開発が望まれている。著者らは、NO導入効率改善のため、Cysを付加した⁴¹⁰Arg Cys変異体を作製し、これにNOを付加した新規S-ニトロソタンパクを作製した。そのNO導入効率は、wild-type-HSAの約4倍まで上昇し、その物性、生物活性及び体内動態特性において、いずれもwild-typeに比べて、S-ニトロソタンパクとして、より優れていることを明らかにしている²¹⁾。今後、Cysを付加した組換え型S-NO-アルブミンの新規NO抱合運搬タンパク(NOトラフィックタンパク)としての応用開発の可能性が大いに期待される。

³⁴Cys架橋による酸素輸液への応用

血液型のない、感染の危険もない輸血に代わる新技術として、人工酸素運搬体の開発が盛んに行われている。土田らは、高濃度酸素輸液の調製を目指して、rHSAに疎水性の合成ヘム

“lipidheme”(ポルフィリン誘導体:Lh)を効率よく包摂させたアルブミン-ヘム複合体(rHSA-Lh)を作製している。このアルブミン-ヘムは自然界に存在しない全く新しい合成ヘム-蛋白質であるが、Hbと同様、酸素分圧に応じて酸素分子を結合解離することが可能であり、HSA1分子あたり8分子のLhを結合できることから、高濃度酸素輸液としての臨床応用が進められている。さらに、最近、rHSA二量体(rHSA₂)を³⁴Cysの架橋形成により作製し、二量体による最大16分子のLhが結合可能となっている。また、このrHSA₂におけるラットの体内動態特性を評価したところ、rHSAの約1.5倍の半減期を示し(Fig. 3.), 更なる高濃度酸素輸液として開発が進められている²²⁾。

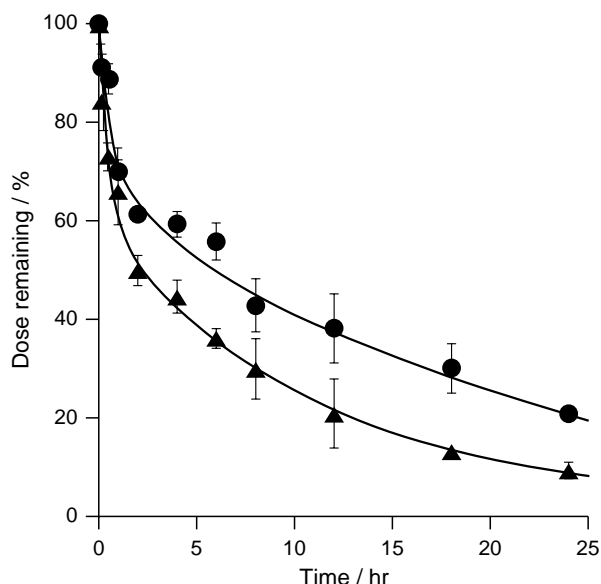


Fig. 3. Plasma levels of ¹²⁵I-rHSA monomer(○) and dimer(△) (1.0 × 10⁷ cpm, 1.0 mg kg⁻¹) after intracardial administration into Wistar rats. All values are mean ± S.D. (n=3) (From Ref. 22)

³⁴Cys架橋による効率的薬物輸送

麻薬性鎮痛薬であるDynorphin Aは、その早い消失のため、頻回投与による副作用が問題となっている。しかし、最近、Holmesらは、³⁴CysとDynorphin AをDrug Affinity Complex (DAC) システムにより1対1の割合で化学的に結合させ、血中滞留性の向上とともに、肝臓、腎臓や脳などへの組織移行を制限に伴う副作用の軽減に成功している²³⁾。現在、ConjuChem社において、第一相臨床試験が行われている。

2) HSAの血中滞留性を利用した薬物動態制御システム

長期作用型インスリン

インスリンは糖尿病治療薬として汎用されているが、その糸球体濾過に伴う消失の促進による頻回投与が問題となっている。Markussenらは、インスリンの²⁹Lysを長鎖脂肪酸の一つであるミスチン酸で修飾し、血液中でHSAと結合可能なアシル化インスリンを設計している²⁴⁾。HSAとの結合はアシル化インスリンの腎臓や肝臓からの消失を抑制し、血中滞留性を改善す

ることから長時間型インスリンへの応用が期待されている。

長期作用型新規リウマチ性治療薬

Fiehnらは、リウマチ様関節炎の新しい治療薬へのアプローチとしてアルブミンのLys残基をN, N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 及びN-hydroxysuccinimide (HSI) により架橋したメトトレキサート (MTX)-アルブミン複合体を設計した²⁵⁾。従来、MTXは、その低分子量により、糸球体濾過に伴うすばやい消失のため、頻回投与による副作用の発現が問題となっていた。しかし、MTX-HSA複合体の開発に伴い、糸球体濾過の抑制に伴う半減期は、約15倍に上昇すると共に、浮腫部位への特異的蓄積が認められ、副作用の軽減にもつながることから、リウマチ様関節炎の新しい治療薬として臨床試験がスタートしている。

3) アルブミン融合技術によるコントロールドリリース

生理活性ペプチドへの応用

米国ヒューマングénomサイエンス社はアルブミン融合技術を用いてサイトカインに応用することに成功している。インターフェロン-HSA接合体; Albuferonは、血中におけるインターフェロンの貯蔵庫として機能するため、C型肝炎の治療に際し、副作用の軽減や投与回数の減少により、患者のQOL向上が期待されている²⁶⁾。さらに同社では、インターロイキン においても同様にインターロイキン -HSA接合体; Albuleukinが開発されている。Albuleukinは、現在、第一相臨床試験が実施されている。Albuleukinの半減期は、インターロイキン の約40倍長く、従来の投与設計を考えると、Albuleukinは、より簡易な投与設計を提供し、患者の負担軽減に貢献できる可能性を秘めている²⁷⁾。

新規抗癌剤への応用

現在、新規抗癌剤として、血管新生阻害剤アンギオスタチンが注目されている。通常、固形癌は、その伸展・転移にあたり新生毛細血管を必要とするため、種々の血管新生促進因子を産生しているため、その抑制は癌を“兵糧攻め”することになる。また血管新生は正常細胞ではほとんど認められないので、血管新生阻害剤では重篤な副作用が起こりにくいと期待される。Bouquetらは、遺伝子融合技術を用いて、アンギオスタチンとHSAの接合体(Adk3-HSA)の開発を行い、Adk3-HSAの著明な半減期の延長と有意な腫瘍増殖阻害効果を得ている(Fig. 4.)²⁸⁾。

4) 高機能性アルブミンの設計と評価

ドメイン

前述したようにHSAの基本構造は相同性の高い3つのドメインから構成されているが、蛋白質の機能解析を行う上でドメイン間の相互作用及び各ドメイン自身の機能解析は必要不可欠である。Carterらは、最近、各ドメインを単独に発現させる系を構築・精製し、相同性の高い3つのドメインの構造を明らかにすることにより、ドメイン毎の高い保存性を証明した。著者らは最近、各ドメインを単独に発現させる系を改良し、ドメイン

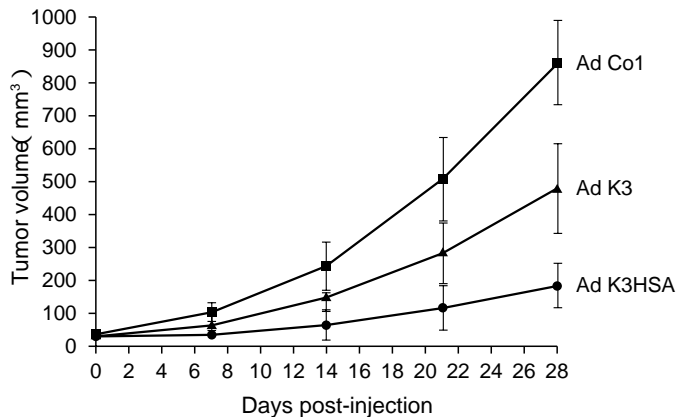


Fig. 4. Systemic treatment of MDA-MB-231 mammary tumors by AdK3-HSA. MDA-MB-231 carcinoma cells were sc implanted into athymic nude mice. 5×10^9 pfu of adenovirus AdK3-HSA (n = 12) AdK3 (n = 10) or AdCO1 (n = 8) was iv injected when the tumors had reached a mean volume of 30 ± 8 mm³ (day 0). Data represent the tumor volume (mean \pm SD) for each group. A Student t test was performed for statistical analysis (P < 0.005) (From Ref. 28)

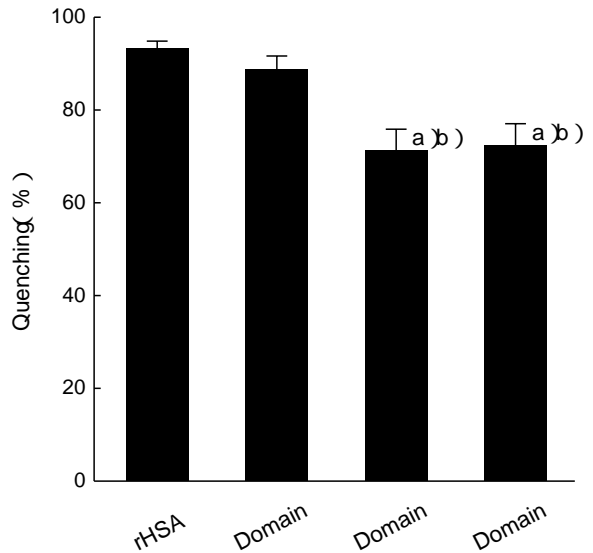


Fig. 5. Quenching of H₂O₂ oxidation of dihydrorhodamine (DRD) by rHSA and individual domains. The sample solutions contained 7.5 μ M rHSA or individual domains in 67 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4 and 25 °C) 5 μ M DRD, and 25 mM H₂O₂. Each bar represents the mean \pm SD (n = 3) a) p < 0.01 vs. rHSA; b) p < 0.01 vs. domain I. (From Ref. 29)

毎の構造の安定化を立証するとともに、薬物結合サイトに関して、サイトの構造及びマイクロ環境保持には、局在しているドメインだけでなく、隣接している他のドメインとの相互作用の重要性を明らかにした。また、サイトは大部分がドメインに位置し、ドメインに保持されていることを明らかにした。加えて、ドメインIはドメインIIと比べ、抗酸化活性をよく保持していることが示された (Fig. 5)²⁹⁾。前述したように、ドメインIIの抗酸化能には34位のfreeのCys残基に加え、Met残基が影響を与えている可能性が考えられている。

アルブミンダイマー (rHSA₂)

従来、アルブミンのダイマー化では、架橋剤を利用した化学的結合のため、均一な結合体の調製の難しさなど多くの問題を抱えていた。最近、W.P.Sheffieldらにより、遺伝子技術を用いた均一なラビット二量体化アルブミンが精製された。しかし、その半減期は、予想に反しwild-typeに比べ短縮していた³⁰⁾。この原因として、均一な二量体は発現しているものの、発現・精製過程におけるアルブミン自身の構造変化が惹起され、消失を促進したものと推察される。事実、著者らも同様に二量体化HSAの発現・精製を行った結果、構造及び機能特性においてHSA-monomerと同様であることを確認した。またその体内動態は、HSA-monomerに比べ、有意に延長していた。これらの知見から、二量体化HSAの生体内挙動は、分子サイズに加えて、その構造安定性により大きく左右されるかもしれない。

5) 高機能性アルブミンを利用した血液透析への応用

HSAの高い結合率を利用した医薬への応用の一つにアルブミン透析 (ECAD; Extra Corporeal Albumin Dialysis) がある。肝不全は種々の毒素の体内蓄積により他の臓器を障害し、しば

しば多臓器不全に進展する。治療として血液濾過透析などの人工肝機能補助療法が行われているが、アルブミンに結合した毒素は除去できず血漿交換との併用が必要である。そこで、ECAD療法により、水溶性毒素とともにアルブミン結合毒素を選択的に除去するシステムである。6時間の治療で血清胆汁酸、ビリルビンが有意に低下することに加え、血漿Nox濃度も有意に低下することから、毒素の除去に伴う血管系、脳、腎及び肝機能の改善に伴う余命の延長が報告されている (Fig. 6)^{31, 32)}。

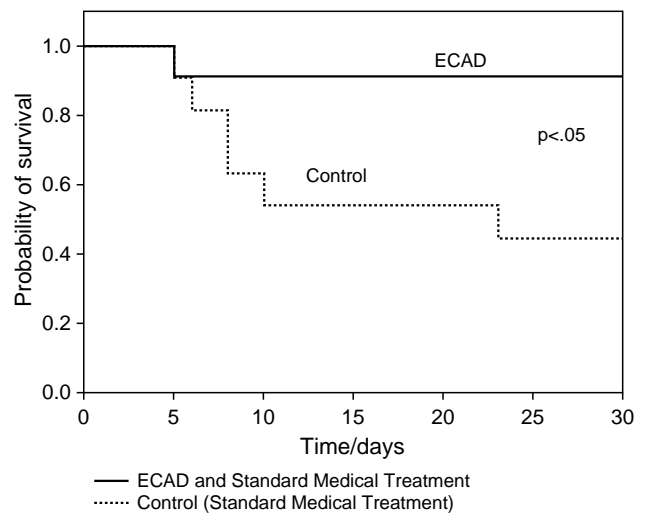


Fig. 6. Kaplan-Meier plot showing 30-day mortality. There was a significant difference between the extracorporeal albumin dialysis and control group (P < 0.05) (From Ref. 32)

このECAD療法に際し、遺伝子組換え型アルブミン、特に高結合能アルブミンの開発は、毒素を結合させるECAD療法において、有用な変異体として利用されるかもしれない。

おわりに

遺伝子組換え技術により、作製されたHSA変異体により機能発現に必須なアミノ酸残基及びその発現部位が明らかにされてきた。また、機能によって、その発現部位の範囲やドメイン間相互作用の関与に大きな違いが認められた。今後、遺伝子組換え技術により、各ドメインを組み合わせたリ、HSAの単量体や多量体分子と接合させることにより、医薬への応用を目指した高機能性組換え型HSAの設計が可能になるかもしれない。

参考文献

1. Peters, T. Jr. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications, Academic Press, San Diego (1996)
2. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys(1990)280,1-8.
3. Ikeda K, Kurono Y, Ozeki Y, Yotsuyanagi T. Esterase-like activity of human serum albumin: structure-activity relationships for the reactions with phenyl acetates and p-nitrophenyl esters. Chem Pharm Bull(1979)27,80-87.
4. Otagiri M, Sugiyama Y, Testa B, Tillement JP. Proceeding of the International Symposium on serum albumin & acid glycoprotein(2000)
5. Subramaniam R, Fan XJ, Scivittaro V, Yang J, Ha CE, Petersen CE, Surewicz WK, Bhagavan NV, Weiss MF, Monnier VM. Cellular oxidant stress and advanced glycation endproducts of albumin: caveats of the dichlorofluorescein assay. Arch Biochem Biophys(2002)400,15-25.
6. Era S, Kuwata K, Imai H, Nakamura K, Hayashi T, Sogami M. Age-related change in redox state of human serum albumin. Biochim Biophys Acta(1995)47,12-16.
7. Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K, Matsushima M, Nakayama M, Hosoya T, Era S. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. Kidney Int(2004)66,1988-1993.
8. Anraku M, Kitamura K, Shinohara A, Adachi M, Suenaga A, Maruyama T, Miyataka K, Miyoshi T, Shiraishi N, Nonoguchi H, Otagiri M, Tomita K. Intravenous iron administration induces oxidation of serum albumin in hemodialysis patients. Kidney Int(2004)66,841-848.
9. Quinlan GJ, Mumby S, Martin GS, Bernard GR, Gutteridge JM, Evans TW. Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury. Crit Care Med(2004)32,755-759.
10. Finch JW, Crouch RK, Knapp DR, Schey KL. Mass spectrometric identification of modifications to human serum albumin treated with hydrogen peroxide. Arch Biochem Biophys(1993)305,595-599.
11. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. Proc Natl Acad Sci U S A(1996)93,15036-15040.
12. Moskovitz J, Berlett BS, Poston JM, Stadtman ER. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A(1997)94,9585-9589.
13. Watanabe H, Kragh-Hansen U, Tanase S, Nakajou K, Mitarai M, Iwao Y, Maruyama T, Otagiri M. Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants. Biochem J(2001)357,269-274.
14. Anraku M, Tsurusaki Y, Watanabe H, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Stabilizing mechanisms in commercial albumin preparations: octanoate and N-acetyl-L-tryptophanate protect human serum albumin against heat and oxidative stress. Biochim Biophys Acta(2004)1702,9-17.
15. Petersen CE, Ha CE, Jameson DM, Bhagavan NV. Mutations in a specific human serum albumin thyroxine binding site define the structural basis of familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. J Biol Chem(1996)271,19110-19117.
16. Chuang VT, Kuniyasu A, Nakayama H, Matsushita Y, Hirono S, Otagiri M. Helix 6 of subdomain III A of human serum albumin is the region primarily photolabeled by ketoprofen, an arylpropionic acid NSAID containing a benzophenone moiety. Biochim Biophys Acta(1999)1434,18-30.
17. Watanabe H, Tanase S, Nakajou K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. Biochem J(2000)349,813-819.
18. Fujino T, Kojima M, Beppu M, Kikugawa K, Yasuda H, Takahashi K. Identification of the cleavage sites of oxidized protein that are susceptible to oxidized protein hydrolase(OPH) in the primary and tertiary structures of the protein. J Biochem(Tokyo)2000)127,1087-1093.
19. Crane MS, Olsson R, Moore KP, Rossi AG, Megson IL. Novel role for low molecular weight plasma thiols in nitric oxide-mediated control of platelet function. J Biol Chem(2002)277,46858-46863.
20. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J. S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and

- antiplatelet properties on the enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A(1992)89,7674-7677.
21. 異島優, 赤池孝章, 芥照夫, 小田切優樹. ヒトアルブミン変異体を用いた新規S-ニトロソタンパクの作成とその生物活性解析, 第26回フリーラジカル学会要旨集(2004) 29.
 22. Komatsu T, Oguro Y, Teramura Y, Takeoka S, Okai J, Anraku M, Otagiri M, Tsuchida E. Physicochemical characterization of cross-linked human serum albumin dimer and its synthetic heme hybrid as an oxygen carrier. Biochim Biophys Acta(2004)1675,21-31.
 23. Holmes DL, Thibaudeau K, L'Archeveque B, Milner PG, Ezrin AM, Bridon DP. Site specific 1:1 opioid:albumin conjugate with in vitro activity and long in vivo duration. Bioconjug Chem(2000)11,439-444.
 24. Havelund S, Plum A, Ribel U, Jonassen I, Volund A, Markussen J, Kurtzhals P. The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin. Pharm Res(2004)21,1498-1504.
 25. Wunder A, Muller-Ladner U, Stelzer EH, Funk J, Neumann E, Stehle G, Pap T, Sinn H, Gay S, Fiehn C. Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis. J Immunol(2003)170, 4793-4801.
 26. Sung C, Nardelli B, LaFleur DW, Blatter E, Corcoran M, Olsen HS, Birse CE, Pickeral OK, Zhang J, Shah D, Moody G, Gentz S, Beebe L, Moore PA. An IFN-beta-albumin fusion protein that displays improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in nonhuman primates. J Interferon Cytokine Res(2003)23,25-36.
 27. Yao Z, Dai W, Perry J, Brechbiel MW, Sung C. Effect of albumin fusion on the biodistribution of interleukin-2. Cancer Immunol Immunother(2004)53,404-410.
 28. Bouquet C, Frau E, Opolon P, Connault E, Abitbol M, Griscelli F, Yeh P, Perricaudet M. Systemic administration of a recombinant adenovirus encoding a HSA-Angiostatin kringle 1-3 conjugate inhibits MDA-MB-231 tumor growth and metastasis in a transgenic model of spontaneous eye cancer. Mol Ther(2003)7,174-184.
 29. Matsushita S, Isima Y, Chuang VT, Watanabe H, Tanase S, Maruyama T, Otagiri M. Functional analysis of recombinant human serum albumin domains for pharmaceutical applications. Pharm Res(2004)21,1924-1932.
 30. McCurdy TR, Gataiance S, Eltringham-Smith LJ, Sheffield WP. A covalently linked recombinant albumin dimer is more rapidly cleared in vivo than are wild-type and mutant C34A albumin. J Lab Clin Med(2004)143,115-124.
 31. Mitzner S, Looock J, Peszynski P, Klammt S, Majcher-Peszynska J, Gramowski A, Stange J, Schmidt R. Improvement in central nervous system functions during treatment of liver failure with albumin dialysis MARS--a review of clinical, biochemical, and electrophysiological data. Metab Brain Dis(2002)17,463-475.
 32. Heemann U, Treichel U, Looock J, Philipp T, Gerken G, Malago M, Klammt S, Loehr M, Liebe S, Mitzner S, Schmidt R, Stange J. Albumin dialysis in cirrhosis with superimposed acute liver injury: a prospective, controlled study. Hepatology(2002)36,949-958.

ヒト赤血球由来ヘモグロビンによるヘモグロビン小胞体の開発と酸素輸液としての医療応用

Development and Clinical Application of Hemoglobin Vesicles as an Oxygen Carrier Using Hemoglobin Derived from Human Red Blood Cells

高木智史 大村光代 太田勝次 須賀裕子 松浦昭宏

Eugene Satoshi Takagi, Mitsuyo Ohmura, Katsuji Ohta, Yuko Suka, Akihiro Matsuura

和文抄録

日本赤十字社より供与された期限切れヒト赤血球より精製，ウィルス除去したヘモグロビンをリポソーム脂質二重膜に内包したヘモグロビン小胞体（HbV）は，ヒト赤血球と比較し粒径は約1/30と小さいが，同等の酸素運搬能を有することがHbVの物理化学実験および種々の実験モデルにおいて証明された．また従来のリポソーム処方の問題とされる血小板活性化，肺臓や腎臓への蓄積等の生体不適合の問題もないことが判明し，さらにラット，サルを用いた安全性試験においても特記すべき副作用は見られなかった．これらHbVの生体内における機能と安全性の評価より，産学協同の国家プロジェクトとして臨床応用を目指した開発が鋭意進行中である．

Abstract

Hemoglobin vesicle (HbV) is prepared by encapsulating virus-free hemoglobin, which is purified from outdated human red blood cells (RBCs) provided from Japanese Red Cross, into liposome with a phospholipid bilayer membrane. HbV with its diameter approximately one-thirtieth smaller than that of RBC is proved to be effective as an oxygen carrier comparable to human red blood cells as evidenced by various physicochemical and pharmacological experiments. Animal studies also demonstrated that HbV was biologically conformable without platelet activation, accumulation in pulmonary and renal tissues and so on, which have been recognized as problems of conventional liposomes, and that HbV caused no notable adverse effect in safety studies using rats and monkeys. Based on these evidences, the research and the development of HbV aiming at its clinical application is intensively in progress as a national project by industry-university cooperation.

Keywords

hemoglobin vesicle, liposome, human hemoglobin, resuscitation, exchange transfusion, safety study

1980年代より早稲田大学理工学部の土田，武岡らによって始められた人工酸素運搬体（ヘモグロビン小胞体；HbV）の開発は，1990年代に慶應義塾大学医学部の小林，末松らがさらに参画し，処方の最適化，製剤規格の設定がなされ，効果・安全性も確認された．2002年より両大学からstart-upした株式会社オキシジェニクスも加わり，これまで両大学の共同研究で蓄積された膨大な技術，データを基に医薬品としての実用化に向けた舵取りがなされた．すなわち，HbVの形状，ヘモグロビン純度等の物性データ，安全性，体内滞留性，体内動態，酸素運搬能

等の生物学的データより，単回投与での救命救急の酸素輸液としての実用化の目途が立ったと判断された．本総説ではHbVの概略と医療応用に向けた最近の知見について述べる．

1. HbVの概念

ヒト赤血球の直径は約8 μm であり，直径が4 μm の毛細血管内を変形して通過し，末梢組織でのガス交換を司る．ヒト赤血球の寿命は約120日と言われているが，老化するに従って赤血球膜のintegrityは失われ，変形能は低下する．一方HbVは日本

赤十字社より供与された期限切れヒト赤血球から精製したヘモグロビンを内包した脂質二重膜構造から成る小胞体で、変形能は有さないが直径250nmと赤血球の約1/30と小さいために毛細管内をスムーズに通過できる (Fig. 1.)²⁾。HbVの内水相のヘモグロビン濃度は35 g/dL、脂質被膜厚は5-10nmとヒト赤血球とほぼ同等である。HbVは膜糖鎖を有していないため、ヒト赤血球で懸念される血液型不適合の問題もなく、また包含するヘモグロビンは熱処理によりウイルスを不活性化・除去しているため^{3,4)}、HIVや肝炎ウイルスは感染のリスクはほとんどなく、未知の感染症についても現行の輸血と比較してリスクは極めて少ないと考えられる。さらにはヒト赤血球が4 においても保存期間は最長21日間に対し、HbVは室温で1年以上の保存が可能である^{1,5)}。

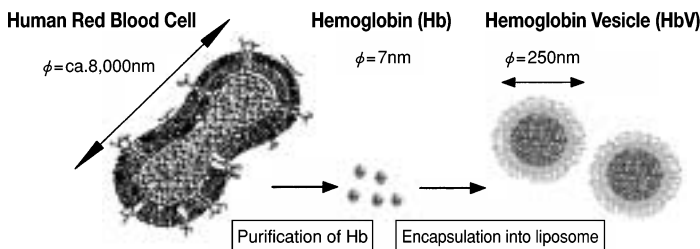


Fig. 1. Schematic representation of hemoglobin vesicle (HbV) prepared from human red blood cells

一方、ヘモグロビンの分子内架橋体や重合体、あるいはヘモグロビン表面に高分子を結合させた修飾ヘモグロビンの開発は米国を中心に行われており、その内のいくつかは臨床試験が進行している⁶⁻⁹⁾。しかしながら粒径が数nmと微小であり、またヘモグロビンが露出していることから、fenestrationを通しての血管外への漏出やヘモグロビンにより一酸化窒素 (NO) がトラップされた結果生じると考えられる血管収縮等の副作用が問題となっている。それに比較してHbVは、先に述べたように直径が大きく、また赤血球同様ヘモグロビンは脂質膜に内包されているためこのような副作用の懸念はない。

2. HbVの機能

人工酸素運搬体としてのHbVの最も、且つ唯一の機能は酸素運搬能である。HbVの酸素飽和度が50%時の酸素分圧 (P_{50}) は27-34 Torrであり、ヒト赤血球の P_{50} 26-28 Torrと非常に近似している^{1,10)}。実験動物におけるHbVの効果はラットおよびイヌで確認されている。

1) ラット50%出血モデル：麻酔下ラットの右総頸動脈より50%の血液 (ca. 28mL/kg) を 1 mL/minの速度で7-8 minかけて脱血し、15分放置後遺伝子組み換え型ヒト血漿アルブミン (rHSA) に分散したHbV、あるいはrHSAを出血量と同量、右総頸静脈より右心房へ挿入したカテーテルより5分間かけて投与し、非処置群と比較した。輸血を全く施さなかった非処置群

では8例全例が死亡したのに対し、rHSA単独群では処置6時間後の死亡率は25% (2/8)、HbVでは0%であった (Fig. 2.)¹¹⁾。このことよりHbVは、非処置やrHSA単独投与を上回る蘇生効果を示し、効率的な酸素運搬能が示唆された。

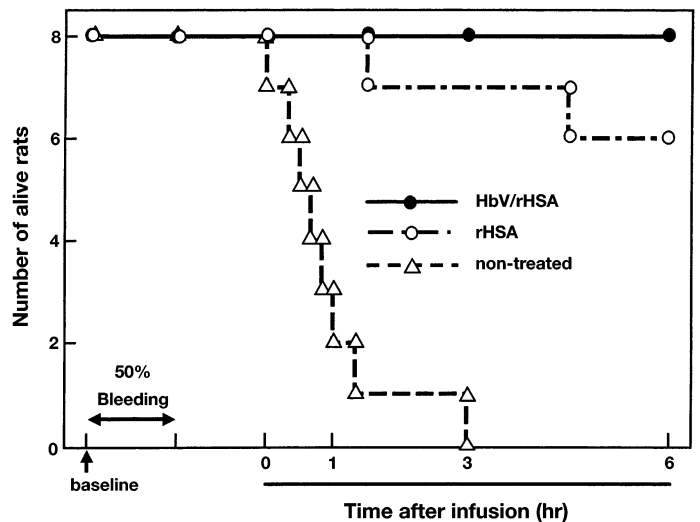


Fig. 2. Resuscitation by hemoglobin vesicle (HbV) in Wistar rats subjected to 50% hemorrhage shock.

Infusion of HbV suspended in recombinant human serum albumin (rHSA) or rHSA was started at 15 min after the 50% bleeding, and then mortality was recorded for 6 hrs. The non-treated group did not receive a resuscitative fluid after the hemorrhage. Eight rats were used for each group. (cited from Crit Care Med 2004;32:539-545)

2) ラット90%交換輸血モデル：麻酔下ラットの右総頸動脈より2 mL/minの速度で脱血し、同時に右総頸静脈より右心房へ挿入したカテーテルを通して同速度でHbV (rHSAに分散) あるいはrHSAを投与し、90%の交換輸血となるまで継続した。rHSA群では、交換輸血に伴い顕著な血圧低下ならびに腎皮質酸素分圧低下が見られたのに対し、HbV群では血圧および腎皮質酸素分圧とも低下は見られず、また心拍数、下腹大動脈血流量、血液ガス分析値等も良好に維持された (Fig. 3.)¹²⁻¹⁴⁾。このことからHbVは優れた酸素運搬能を有することが示唆された。

3) 体内有効HbV：カニクイザルにHbV 10 mL/kg静脈内投与し、血漿中のHbV由来の総ヘモグロビンおよび非メト化ヘモグロビンを測定した。両ヘモグロビンとも経時的に低下したが、非メト化ヘモグロビンの消失半減期は約15時間と見積もられ、救命救急臨床に十分なポテンシャルを有していることが判明した¹⁵⁾。

3. HbVの生体適合性

リポソーム処方大きな問題点の一つとして、血小板を活性化し、凝集を惹起することがあげられる。これはリポソームの

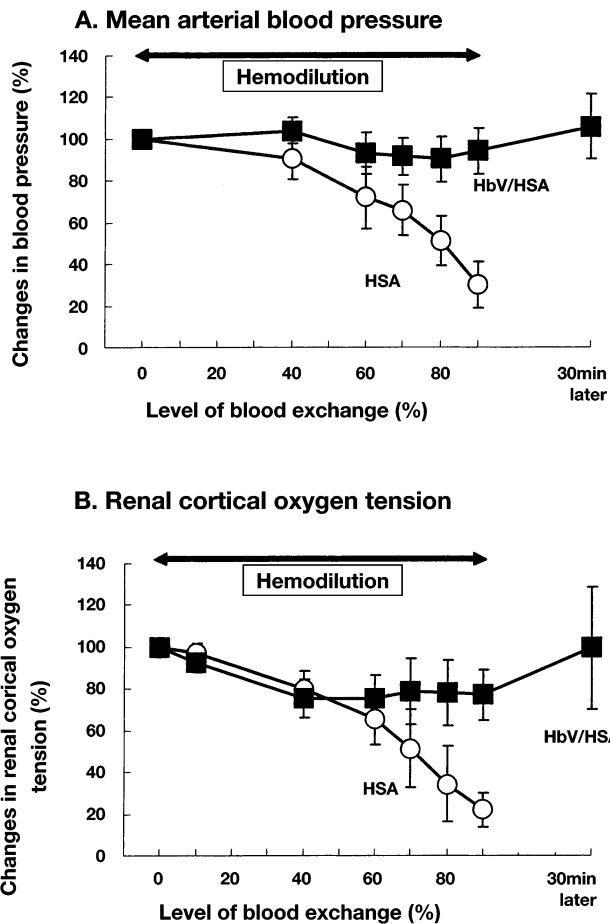


Fig. 3. HbV preserved arterial blood pressure and renal cortical oxygen tension depressed in Wistar rats subjected to 90% exchange transfusion

Ninety percent of estimated total circulating volume of blood (56 mL/kg) was exchanged with 5% human serum albumin (HSA, n=6) or HbV suspended in HSA (HbV/HSA, n=6) at 2 mL withdrawal/infusion cycles at a rate of 2 mL/min. Blood pressure was monitored by a pressure transducer connected to a catheter inserted into the common carotid artery. Renal cortical oxygen tension was measured by a needle polarographic oxygen electrode placed in the cortex of the left kidney. (cited from ASAIO Journal 1997;43:289-297, Bioconjugate Chem 1997;8:23-30, Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol 1997;25:357-366)

脂質二重膜の構成成分に関する。HbVでは血小板を活性化させない新脂質成分として 1,5-O-Dihexadecyl-L-succinyl-L-glutamate (DHSG) を配合し¹¹⁾、ラットおよびカニクイザルにおいてその有用性が実証された。すなわちラットにおいて各種リポソームを2 mL/bodyの投与量で投与し40分後の静脈血中の血小板数を測定した結果、他の一般的なリポソーム成分構成では血小板が約20-50%減少したのに対し、HbVでは全く減少を示さなかった¹⁶⁾。カニクイザルにHbV 5, 10, 20 mL/kgの単回静脈投与後の血小板数は、投与後2週間にわたって背景値内で推移し、また出血時間の変動も殆ど認められなかった (Fig. 4.)⁵⁾。更には一般的なリポソームがトラップされることが知ら

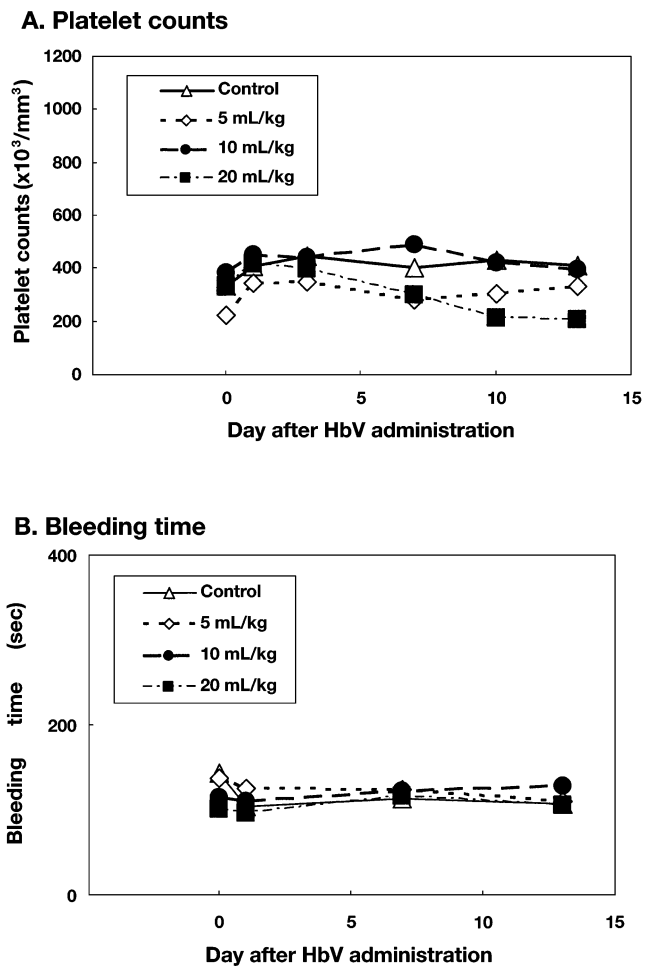


Fig. 4. Platelet counts and bleeding time in rats treated with single HbV administration in cynomolgus monkeys.

Intravenous infusion of HbV was carried out at doses of 5, 10, and 20 mL/kg (5 mL/min) and then venous platelet count and bleeding time according to Simplate method were measured. Three animals were used for each group.

れている肺臓、および修飾ヘモグロビンの毒性が見られる腎臓の試験終了後の組織剖検においても、HbV 5, 10, 20 mL/kgの投与による変化は特に認められなかった¹⁵⁾。以上より、HbVの生体適合性については問題ないと判断される。

4. HbVの安全性および生体内運命

Wistar系雄性ラットにHbVを20 mL/kgの投与量で尾静脈より投与した結果、脾臓の重量(比体重)の増加、血清アルブミンの減少等が見られたがいずれも軽微であった。血清中コレステロールは経時的に増加し、投与2日後に最高値となり、その後漸次減少し1週間後には前値に復した (Fig. 5.)⁷⁾。他には特筆する変化は認められなかった。

カニクイザルにHbVを5, 10および20 mL/kgの投与量で単回静脈内投与し、投与後の血漿中のHbV由来ヘモグロビン (HbV-Hb) 濃度推移を2週間にわたって観察した。いずれの

投与においても血漿中のHbV-Hbは経時的に低下し、最終消失相の半減期は10 mL/kgで2.8日、20 mL/kgで2.9日であった。脂質代謝に関し、血清の総コレステロールは10 mL/kgおよび20 mL/kg投与群で投与後7日および13日で上昇していた。また5 mL/kg/dayおよび10 mL/kg/dayの7日間反復投与においても、血清コレステロールは8日目で降上昇していた¹⁵⁾。これらラットおよびサルで見られた血清コレステロールの増加は体内で代謝されたHbVのリポソーム成分によるものと考えられた。今後精査を要する。

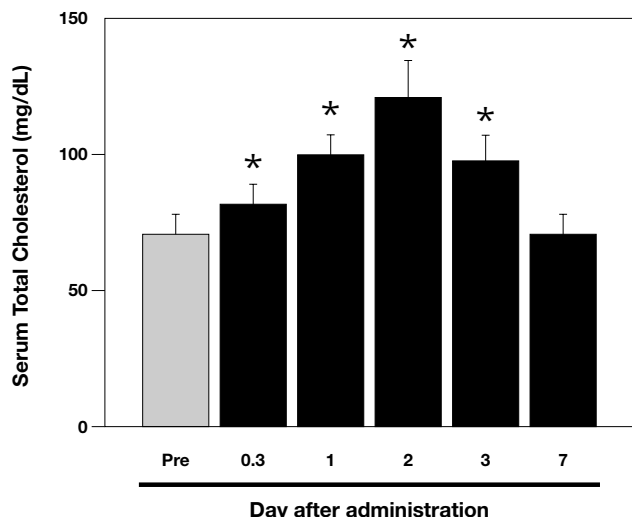


Fig. 5. Changes in serum total cholesterol after single intravenous administration of HbV in rats.*; significantly different from pre-value ($p < 0.05$)

HbV was intravenously administered in Wistar rats ($n=5$) at a dose of 20 mL/kg, and serum cholesterol level was measured 0, 0.3, 1, 2, 3, 7 days after the administration (cited from Biomaterials 2004;25:4317-4325)

5. 臨床応用に向けた取り組み

2004年秋に米国食品医薬品局 (FDA) より試案として赤血球代替物のガイドンス (Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Blood Cell Substitute) が出された¹⁸⁾。それによると、赤血球代替物による酸素治療の潜在的な利点は、1) 万能な適合性、2) 緊急使用、および3) 長期保存であるとしている。さらに「赤血球代替物による酸素治療の有効性および安全性検討のための指標」ならびに「リスクとその利点評価」のための臨床試験デザインに関するガイドンスが示され、適用として1) 局所的酸素供給 (心臓血管手術時灌流、放射線治療あるいは化学療法時の腫瘍の感受性増強など)、2) 手術中およびその前後の適用 (待機的外科手術)、3) 外傷、をあげている (Table 1.)。また赤血球代替物による酸素治療薬は最優先審査承認制度 (Fast Track) の対象になるとされている。まだ草稿段階とはいえ、FDAが

このようなガイドンスを出したということにより、人工血液開発に関し具体的な指針と新たな局面を与えたと判断される。ガイドンスには、人工血液はOxygen Therapeuticと表記されていることにより、血液代替物として血液と比較しての存在ではなく、酸素治療薬としての新しい存在意義を獲得したと考えられる。

Table 1. Potential indications for oxygen carriers*

1. Local Effects/Regional Perfusion

- 1) Perfusion during coronary angioplasty
- 2) Increasing the sensitivity of tumors to radiation or to chemotherapy

2. Perioperative Indications

- 1) Elective surgical indications

3. Trauma

*; U.S. Food and Drug Administration. Draft Guidance for Industry: Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Blood Cell Substitutes - 10/28/2004

人工血液としては、米国Northfield Laboratories社 (<http://www.northfieldlabs.com>) のヒト由来ヘモグロビンの重合体を製剤化したPolyHeme[®]の開発が進行している。救命救急での出血性ショックを対象とし、現在第 相臨床試験を実施している。生理食塩液を対照薬として720名の重篤な出血性ショック患者に盲検的に救急車内・病院到着後12時間まで投与し、エンドポイントとしてその後30日間フォローアップするというものである。本臨床試験では、救命救急に用いられるということで一般的なインフォームド・コンセントの適用は除外された。

このように人工血液を取り巻く状況の変化の中で、HbVは世界初のセル型人工酸素運搬体として位置づけを確保すべく、臨床応用への取り組みが進行している。先に述べたHbVの生体内における機能と安全性の評価より、実用化に向けたHbVの製剤処方が決定された。同時にHbV製剤の規格・試験法の設定とともに、製造規模の拡大の検討がすでに開始された。1990年代初めには1バッチあたり数十mLであったが、文部科学省、厚生労働省の科学研究費助成によって量産化技術が進展し、2002年には2L/batchと、またHb精製量も4L/batchと大幅に向上したことよりGMPスケールアップが可能と判断された。そこで早稲田大学の指導のもと、ニプロ株式会社と協力して工業化を推し進めている。すなわちオキシジェニクス社京都研究所において早稲田大学からの技術移転により工業化を目指した小規模製造を開始し、さらにニプロ社により大規模製造のための工業化検討を行う予定である。また早期の臨床応用を目指して適応症の絞込みも行われ、2006年に臨床研究を開始すべく順調に準備が進んでいる。

早稲田・慶應義塾大学の共同研究から技術確立されたヒトヘモグロビン小胞体は、オキシジェニクス社による非臨床試験・臨床試験およびパイロットスケールの製造、ニプロ社による治療薬・最終製品の製造という役割分担の中、産学協同の国家プロジェクトとして、また国際展開についても視野に入れ、早期の臨床応用を目指して開発を行っている。

6 . 謝辞

本研究を進めるにあたり，終始ご指導を賜った早稲田大学名誉教授土田英俊先生，慶應義塾大学医学部教授小林紘一先生，末松誠先生，早稲田大学工学部助教授武岡真司先生，ならびに両大学の諸先生方に心より御礼申し上げます．

7 . 引用文献

1. 土田英俊，酒井宏水，武岡真司，宗慶太郎，小林紘一．酸素輸液（人工赤血球）．*医学の歩み* 2003;205:558-566
2. Sakai H, Tsai AG, Rohlf s RJ, Hara H, Teraoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red cell substitutes: influence of O₂ affinity. *Am J Physiol* 1999;276:H553-H562
3. Naito Y, Fukutomi I, Masada Y, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Abe H, Hirayama J, Ikebuchi K, Ikeda H. Study of virus removal from hemoglobin solution using PLANOVA-M-15M. *J Artf Organs* 2002;5:141-145
4. Fukutomi I, Sakai H, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, Sakai K. Carbonylation of oxyhemoglobin solution using a membrane oxygenator. *J Artf Organs* 2002;5:102-107
5. Sakai H, Tomiyama K, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E. Polyethyleneglycol-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjug Chem* 2000;11:425-432
6. Mullon J, Giacoppe G, Clagett C, McCune D, Dillard T. Transfusions of polymerized bovine hemoglobin in a patient with severe autoimmune hemolytic anemia. *N Eng J Med* 2000;342:1638-1643
7. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Malloy MN, Rodman Jr G. Diaspirin crosslinked hemoglobin(DCLHb)in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trials. *JAMA* 1999;282:1857-1864
8. Carmichael FJ, Ali AC, Campbell JA, Langlois SF, Biro GP, Aillan AR, Pierce CH, Greenburg AG. A phase I study of oxidized raffinose cross-linked human hemoglobin. *Crit Care Med* 2000;28:2283-2292
9. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Burch JM, Haenel JB, Garcia J, DeWoskin R, Moss GS. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. *J Am Coll Surg* 1998;187:113-120
10. 武岡真司．人工血液（人工赤血球）の開発動向．*日医雑誌* 2004;131:907-910
11. Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, Yamamoto M, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhage shock in anesthetized rats. *Crit Care Med* 2004;32:539-545
12. Izumi Y, Sakai H, Kose T, Hamada K, Takeoka S, Yoshizu A, Horinouchi H, Kato R, Nishide H, Tsuchida E, Kobayashi K. Evaluation of the capabilities of a hemoglobin vesicle as an artificial oxygen carrier in a rat exchange transfusion model. *ASAIO Journal* 1997;289-297
13. Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Takeoka S, Nishide H, Izumi Y, Yoshizu A, Kobayashi K, Tsuchida E. Surface modification of hemoglobin vesicles with polyethyleneglycol and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem* 1997;8:23-30
14. Kobayashi K, Izumi Y, Yoshizu A, Horinouchi H, Park SI, Sakai H, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E. The oxygen carrying capability of hemoglobin vesicles evaluated in rat exchange transfusion models. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1997;25:357-366
15. オキシジェニクス社内資料
16. 特開 2004-269442 リポソーム安定化剤
17. Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, Takeoka S, Takaori M, Kobayashi K, Tsuchida E. Metabolism of hemoglobin-vesicles(artificial oxygen carriers)and their influence on organ functions in a rat model. *Biomaterials* 2004;25:4317-4325
18. U.S. Food and Drug Administration. Draft Guidance for Industry: Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Blood Cell Substitutes - 10/28/2004

完全合成型人工酸素運搬体の開発

Development of Totally Synthetic Artificial Oxygen Carrier

甲斐俊哉, 木田善規, 福富一平, 帆足洋平, 片山直久, 山本尚志, 大川裕紀, 弘津一郎, 佐藤 誠
Toshiya Kai, Yoshinori Kida, Ipeei Fukutomi, Youhei Hoashi, Naohisa Katayama, Hisashi Yamamoto,
Hiroki Ohkawa, Ichiro Hirotsu, Makoto Sato

和文抄録

我々は、遺伝子組換えヒト血清アルブミン分子中に合成ヘム誘導体を最大で8分子包接させた、全く新しい完全合成型人工酸素運搬体であるアルブミン-ヘムの開発を進めている。アルブミン-ヘムはカプセル化の必要がなく、それ自身がアルブミン由来の膠質浸透圧を保有しており、また一酸化窒素(NO)捕捉による血圧上昇等の副作用も示さない。アルブミン-ヘムの大量製造方法を既に確立しており、その概要を示すとともに製剤特性をまとめた。またラットを用いた交換輸血試験の結果、アルブミン-ヘムは明らかな酸素運搬効果を示した。

さらに、ヒトヘモグロビンカプセル型人工酸素運搬体(Hb-V)についても、(株)オキシジェニクスとの共同開発を進めている。現在のところ、最も臨床試験に近い段階に進んでいる人工酸素運搬体であるが、献血由来のヘモグロビンを使用しているため、感染の危険性や安定供給の問題が完全には解決されていない。そこで、遺伝子組換えヒトヘモグロビン(rHb)の開発にも着手した。既にrHbの発現を確認しており、現在大量製造方法の検討に着手している。

これらの人工酸素運搬体の製造施設を当社注射剤工場と併設して設置するために準備を進めているところである。

Abstract

Development of an innovative and original artificial oxygen carrier, albumin-heme, which consists of recombinant human serum albumin(rHSA)and synthetic heme derivative, has been promoted in our company. Albumin-heme, in which maximally eight molecules of synthetic heme are incorporated into albumin molecule, has a suitable colloidal osmotic pressure itself and also do not have side effects such as hypertension due to depletion of nitric oxide(NO) Large-scale production process has already been established. Characteristics of albumin-heme are described in this paper. Furthermore, the exchange transfusion experiments in rats revealed that albumin-heme had oxygen carrying properties.

We also have been developing a hemoglobin vesicle as another type of artificial oxygen carrier in collaboration with Oxygenics Inc. This type of oxygen carrier is the most promising preparation close to clinical use. However, some risks of infection and uncertainty of stable blood supply still exist because of use of donated human blood as raw material. So, we decided to develop recombinant human hemoglobin(rHb) A purified rHb has already been obtained by our original expression method. At the present, we have been preparing for large-scale production facilities in our pharmaceutical factory in Japan to produce these artificial oxygen carriers as mentioned above.

Keywords

synthetic oxygen carrier, albumin-heme, synthetic heme, hemoglobin vesicle, recombinant human hemoglobin, recombinant human serum albumin

緒言
 米国を中心にヘモグロビン修飾型の人工酸素運搬体(修飾Hb)が開発中であるが、いずれもヒトあるいはウシのヘモグロビンを原料としており、その安全性と安定供給に懸念が残る。

また、これらの修飾Hbは、ヘモグロビン（Hb）濃度の上昇により膠質浸透圧及び粘度が上昇するため、生体に投与できるHb量が限られており、結果として酸素運搬能に限界が認められる。また、天然の赤血球のように細胞膜に覆われていないため、Hbが容易に逸脱し、NO捕捉による血管収縮といったHb自体の毒性の発現やHb機能維持のための解糖系酵素やメトHb還元酵素等の各種酵素系の保持ができないため安定性が悪いといった問題点が依然として指摘されている^{1,2)}。これに対して日本国内ではリポソームにヘモグロビンを内包した、細胞型人工酸素運搬体の開発が進められている。これらの製剤はヘモグロビンの副作用を低減し、より安全で有効性の高い人工酸素運搬体として最も臨床に近い段階に開発が進んでいる。一方でこれらの人工酸素運搬体は献血由来の原料に依存している点で、国内使用に限定されるとともに安定供給にも不安が残る。

我々は、遺伝子組換えヒト血清アルブミン（rHSA）の高純度、高生体適合性、非感染性、量産性などの特徴に着目し、rHSAに可逆的酸素配位能を有する合成ヘムを包接させた新規の完全合成ヘム蛋白質（アルブミン-ヘム）の開発を行っている。このアルブミン-ヘムは修飾ヘモグロビンで認められるNO捕捉による血管収縮作用は有していない。既に合成ヘムの選定が終了し、ラット、イヌを用いた交換輸血実験で有効な酸素運搬能を確認している。本稿では、アルブミン-ヘムの製剤としての安定性、製造方法、動物での評価結果について報告する。

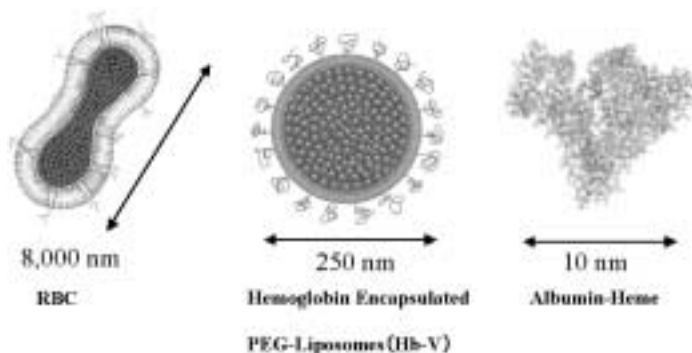


Fig. 1. Two types of artificial oxygen carrier under developing in NIPRO.

一方、Fig. 1.に示すように、ヘモグロビンを封入した細胞型人工酸素運搬体（Hb-V）の開発も併行して進めており、(株)オキシジェニクス、早稲田大学、慶応義塾大学とともにHb-VのGMPに準拠した製造施設の設置を準備中である。さらに内包する献血由来のヘモグロビンを遺伝子組換えヘモグロビン（rHb）に置き換えるためにrHbの開発にも着手している。これらの概要についても紹介する。

これらの完全合成型人工酸素運搬体は、原料供給の不安が払拭されるだけでなく、感染の危険性も回避できるため、酸素運搬能を有する薬剤としての全く新しい利用展開も可能となる。本稿で紹介する2種類の完全合成人工酸素運搬体は赤血球より

極めて小さいという特長を生かし（Hb-Vで250 nm、アルブミン-ヘムで10 nm）、腫瘍の酸素化、虚血部位の酸素化による治療効果の向上についても臨床応用を目指した評価を進めている。これらの市場は赤血球市場（国内約300億円、日米欧で約2,400億円）と同等以上の市場が予測されており、新たな治療手段として今後の期待が大きい。

開発概要

1. アルブミン-ヘム

(1) アルブミン-ヘムの概要

アルブミン-ヘムはFig. 2.に示したように、rHSAの分子中に合成ヘム誘導体を包接した全く新しい概念の人工酸素運搬体である。ヘムの結合サイトはサブドメイン b, a, bなどが推定されており、rHSA 1分子当たり最大8分子のヘムが取り込まれる^{3,7)}。アルブミン-ヘムのCDスペクトルはrHSA単独の場合とほぼ重なっており、 α -helixの含量（約67%）も変わらない。我々のグループは世界に先駆けて開発に成功したrHSAを保有しており⁸⁾、合成ヘムとの組み合わせにより、感染の危険性のない完全合成型の人工酸素運搬体として開発を進めている⁹⁾。

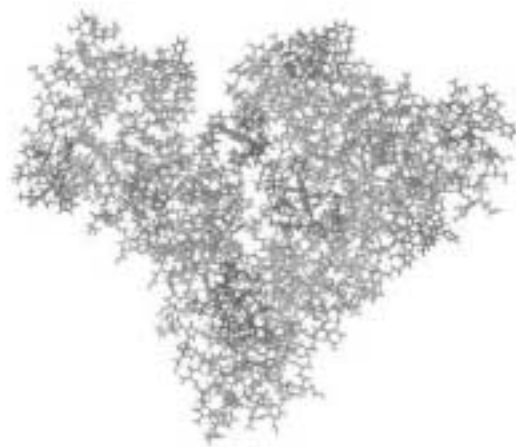


Fig. 2. Stereo view of albumin-heme
Maximally, 8 molecules of synthetic heme can be incorporated into albumin molecule.

酸素配位最小単位分子であるヘム鉄を血漿蛋白質であるアルブミンの内部に包接させた構造のアルブミン-ヘムはカプセル化の必要がなく、そのまま投与できることが最大の利点であり、加えて、膠質浸透圧の調節能を有し、調製が容易、低コストなど、優れた特徴を持つ。また、欧米で開発が進行している修飾Hb製剤は、平滑筋近傍への逸脱とNO捕捉に伴う血管収縮・血圧上昇が問題視されているが^{1,2)}、アルブミン-ヘム製剤を生体内へ投与しても、そのような副作用は全く観測されない¹⁰⁾。アルブミン-ヘムもHbと同様にNOを強く結合するものの、アルブミンの等電点が4.8と低いために、血管内皮細胞を覆う基底膜（厚さ50 nm）との間に静電反発を生じ、Hb粒子に比べて

血管外へ漏出しにくいことを考えている。現状は、ヘム誘導体の選定作業を終了し、輸血代替のみならず、腫瘍の酸素化による放射線治療効果の向上、虚血部位の酸素化等の新しい適応症へ向けた評価を行っているところである。

Fig. 3.に選定したヘム誘導体の構造を示した。ポルフィリン骨格を有したピケットフェンス型と呼ばれるポルフィリン誘導体(テトラアミノフェニルポルフィリン誘導体)であるが、分子内に軸塩基として作用する側鎖を有しており、ポルフィリン環の図中下側から第5座配位子として配位することにより、酸素分子の結合力を調整することができるという特徴を有している。種々の誘導体の中から有効性や安全性を中心に評価した結果、図中右に示したシクロヘキサノイルアミノフェニル誘導体を選択した¹¹⁾。

(2) 製造方法

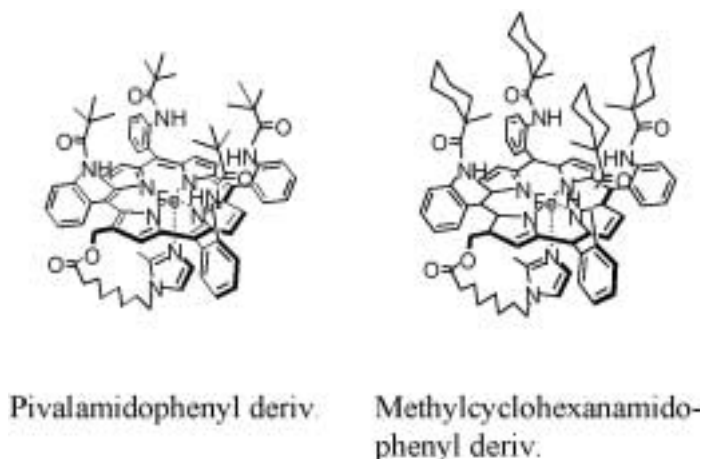


Fig. 3. Molecular structures of synthetic hemes.

アルブミン - ヘムの製造方法概略をFig. 4.に示した。アルブミン水溶液とヘム誘導体エタノール溶液を至適条件で精密に混合攪拌することにより、アルブミン分子中にヘム誘導体が包接されたアルブミン - ヘムが出来上がる。包接させるヘム誘導体の数は化学量論的な添加量を変化させることで容易に調整できる。不純物としてのエタノールを除去することを目的として透析(定容量限外濾過)の後、塩濃度の調節並びに濃縮を行い、最終的にアルブミン濃度5%としてアルブミン - ヘム溶液を得る。

なお、製造中のヘム誘導体の安定性を維持するために、アスコルビン酸添加によって予め鉄を還元しておいたヘム誘導体溶液をCOガス通気し、CO結合体として最終アルブミン - ヘム製剤を得る。得られたアルブミン - ヘムの特性をTable 1.に示した。

一方、Fig. 5.に示したようにCO結合体は安定であるが、使用に先立ち、酸素化の操作が必要であるという欠点を有しており、以下に述べるCOを用いない製造方法の検討を併行して進めてきた。

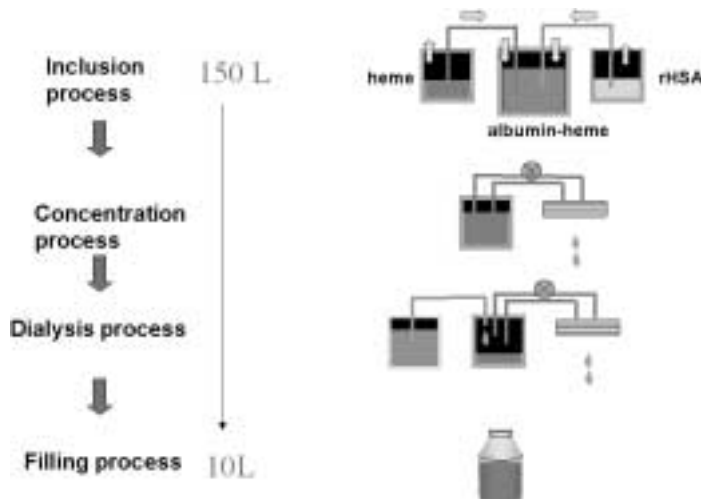


Fig. 4. Outline of manufacturing process of albumin-heme.

Table 1. Physico-chemical characteristics of albumin-heme.

Items	Standard values
[rHSA] (g/dL)	5
[heme] (mM)	3-6
heme/rHSA(mol/mol)	4-8
P ₅₀ (Torr)	28-38
rHSA pI	4.8
rHSA -helix content(%)	67
Stretching vibration of coordinated O ₂ (cm ⁻¹)	1158
Stretching vibration of Fe-O ₂ (cm ⁻¹)	561
Met-heme(%)	<3
Viscosity(cP at 230s ⁻¹)	1.1
Specific gravity(g/cm ³)	1.01
Crystal osmotic pressure(mOsm)	300
Colloidal osmotic pressure(Torr)	19
pH(37)	7.4
Endotoxin(EU/mL)	<0.2

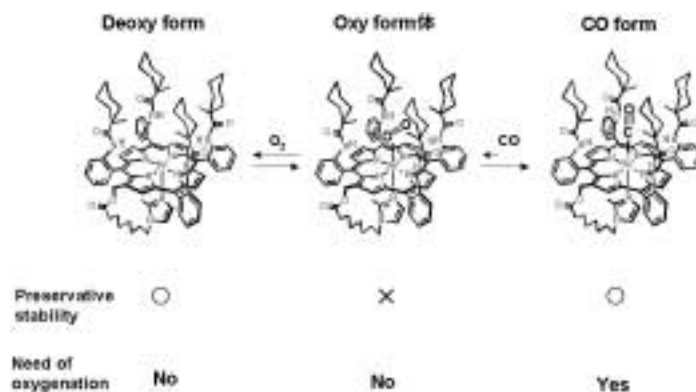


Fig. 5. Comparison of preservative stability and need of prior oxygenation among 3 forms.

(3) COを用いない製造方法

血液透析の際に使用する種々の透析膜（ダイアライザー）を脱酸素工程に利用することを試みた。その結果、トリアセート製中空糸内にアルブミン・ヘムを流し、密閉ハウジング内の中空糸の外側（本来透析液が灌流するスペース）に加湿したN₂ガスをフローしながら、濃縮された量だけ連続して透析液を補充する定容量限外濾過を行うことによって製造工程を低酸素状態（0.1 Torr未満）で維持することができることを見出し（Fig. 6.）、アルブミン・ヘムをデオキシ体として製造することに成功した。デオキシ体の保存安定性を評価した結果をTable 2.に示した。現在のところ、室温保存で6箇月の保存安定性が確認されており、メト化率も初期値と比較して全く変化しないことが明らかとなった。さらに継続して安定性を評価中である。

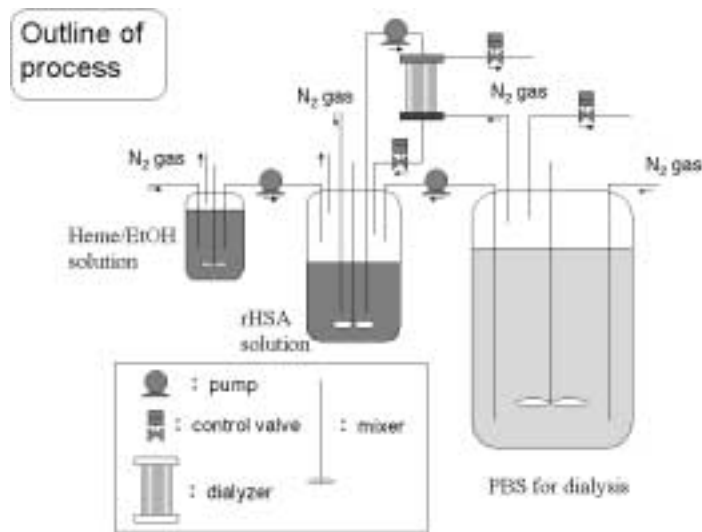


Fig. 6. Manufacturing process of deoxy form under nitrogen atmosphere using blood dialyzer.

Table 2. Stability of deoxy form albumin-heme at room temperature for 6 months.

	Initial	After 6 months
Appearances	good	good
P ₅₀ (Torr)	34.7	34.7
[rHSA] (%)	5.08	5.35
[Albumin-heme] (mM)	2.75	2.77
Met conversion (%)	1.07	1.08
Viscosity (cP)	1.16	1.16
pH	7.13	7.14
[FeP] / [Alb]	3.3	3.4
UV _{max} (nm)	CO	426.5
	Oxy	424.5
	Deoxy	443.0

(4) 具体的製剤例

当社は、無菌充填、無菌の液・粉キット注射製剤等の製造を得意としていることもあり、通常ガラスバイアル充填製剤の

みならず、Fig. 7.に示したような凍結乾燥粉末製剤、さらにFig. 8.に示したような凍結乾燥粉末と溶解液のキット製剤としての開発を検討している。災害等に備えた長期備蓄には保管スペースあるいは安定性の維持の面から極めて優れた形態であると思われる。



Fig. 7. Examples of filling product in glass vial
left: solution preparation, right: freeze-dried powder.



Fig. 8. Example of kit product consists of freeze-dried powder and solvent for injection.

(5) 脱血交換モデルを用いた薬効評価

既に様々な動物評価を行っているが、その中からラットの脱血交換モデルを用いた薬効評価結果を紹介する。

Fig. 9.に実験操作の概略を示した。7～9週齢のWistar系雄性ラット（体重282.3～335.4 g）をウレタン麻酔下に1群5匹として使用した。呼吸数は気管内に挿管したカニューレを熱感知用センサーに接続して測定し、脱血交換開始から呼吸停止までの時間を生存時間とした。血圧は、左大腿動脈内にカテーテルを留置し、圧トランスデューサを介して測定した。被験薬と

の脱血交換輸注は、右総頸動脈より3 mL/kg/min の速度で脱血すると同時に被験薬を右大腿静脈から同速度で投与して行った。ヘマトクリット値は脱血交換開始後10ないし15分間隔で右外頸静脈より採取した血液を用いて測定した。rHSA 及びアルブミン - ヘム投与群のヘマトクリット値から、時間 - 血液希釈率曲線を作成し、血液希釈率 = $100 \times e^{-0.0849 \times \text{時間}}$ (相関係数0.999) の式を得た。本式を用い、生存時間及び平均血圧測定時点の血液希釈率を算出した。なお、直腸温は実験終了まで 37.0 ± 1.0 に維持した。

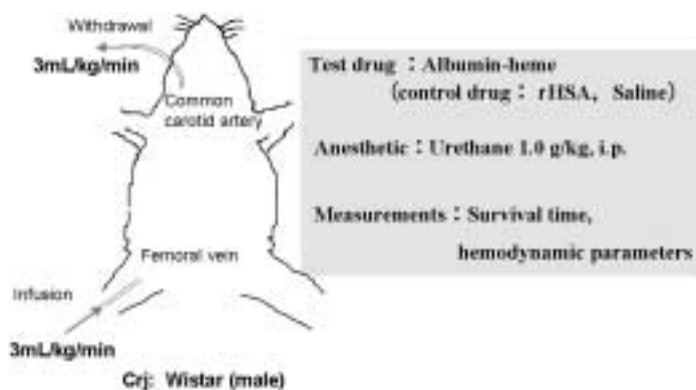


Fig. 9. Rat exchange transfusion model.

Fig. 10. に最大血液希釈率および平均血圧の推移を示した。図には示していないが、ヘマトクリット値はrHSA及びアルブミン - ヘムの脱血交換輸注により経時的に低下し、群間に差は認められなかった。アルブミン - ヘム投与群 (生存時間 45.46 ± 1.51 分) は、生理食塩液投与群 (生存時間 21.48 ± 0.71 分) 及びrHSA単独投与群 (生存時間 32.07 ± 1.15 分) に比べて有意な延命効果を示し、最大血液希釈率を有意に上昇させた。

アルブミン - ヘム投与群の平均血圧は、生理食塩液投与群およびrHSA投与群に比べ有意に高値を示し、血圧維持効果が認められた。

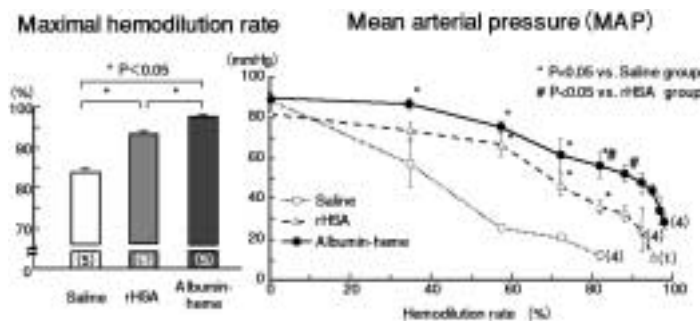


Fig. 10. Mean arterial pressure and hemodilution rate during exchange transfusion by albumin-heme, rHSA and saline in urethanized rats. The data represent means \pm SEM of 4-5 rats. Figures in parenthesis show No. of animal survived.

以上の結果から、酸素結合能を有するアルブミン - ヘムは、酸素結合能を持たないrHSAと比較し、血液希釈に伴う呼吸・循環器系変化を遅延させ、明らかな延命効果を示したことから、生体内で酸素運搬能を発揮しているものと考えられた。

2. 遺伝子組換えヘモグロビン (rHb)

早稲田大学、慶應義塾大学の研究グループは、ポリエチレングリコールで表面修飾を施した生体適合性の高いリポソーム中にヒト血液由来のヘモグロビンを内封した細胞型の人工酸素運搬体 (Hb-V) の開発に永年に亘って取り組んでいる。このリポソーム封入型人工酸素運搬体は、非カプセル型の持つ問題点を克服できるものとして既に多くの成果が報告され¹²⁻¹⁸⁾、実現の可能性という意味において他を一歩リードした製剤であり、早期の臨床治験開始が望まれている。当社も、(株)オキシジェニクス (早稲田大学、慶應義塾大学のリポソーム封入型人工酸素運搬体を開発することを目的として設立されたバイオベンチャー企業) とともにこのリポソーム封入型人工酸素運搬体の開発を共同で行っている。

しかし、ヒト血液 (献血) から抽出した精製ヘモグロビンを使用する点で、感染の危険性や供給量の問題は完全には解決されておらず、ヘモグロビンを遺伝子組換え体に置き換えることも今後の展開として極めて重要であると考えている。

rHbの開発に関しては、既に幾つかの事例が報告されている。いずれもHbの二量体への解離を防止するための架橋体であるが、非細胞型 (非カプセル化) 製剤であるため、修飾Hbで認められる副作用を回避出来ずに開発が中止となっている。Baxter 社がHemeAssistTMとして開発した分子内架橋Hbは、2本のHb鎖99番目のLys間をフマル酸架橋したものである。しかし、外傷に対する輸血代替療法において、従来法よりも死亡率が高くなったため、臨床試験が中止された¹⁹⁾。さらに遺伝子組換え技術を用いて培養菌体に発現させたrHbは、Somatogen Inc. 社によってOptroTMとして具体化された。ヒトHbのアミノ酸配列の一部を変換して二量体への解離防止と適当な酸素親和性が実現されている。臨床第 相試験では、投与直後に一過性の血圧上昇が起こり、軽い嚥下障害、吐き気や嘔吐などが訴えられ、食道や胃腸に変形が認められた²⁰⁾。これらの症状はすべてHb分子が血管平滑筋部位まで拡散し、血管弛緩因子であるNOを捕捉する作用に関連しているものと考えられている。

一方、我々の今日に至る様々な共同研究の結果、熊本大学の組換え蛋白質製造技術とグループ (株)パイファ) の組換え蛋白質開発・製造ノウハウを融合させることで、全く新たに遺伝子組換えヘモグロビンを開発する目処が得られた。カプセル化技術は早稲田大学と慶應義塾大学の永年の共同研究から、既にその製造技術が確立されており、これらの技術をそのまま応用することでリポソーム封入型遺伝子組換えヘモグロビン (rHb-V) が実現に近づいたことになる。

(1) rHbの発現方法

熊本大学で開発された大腸菌における高発現・高コピーベクターであるpBEXベクター（特願2003-1885）をFig. 11.に示した。このベクターに予め合成しておいたヘモグロビン鎖と鎖の遺伝子を組み込み、大腸菌で4量体のヘモグロビンとして発現させることに成功した。

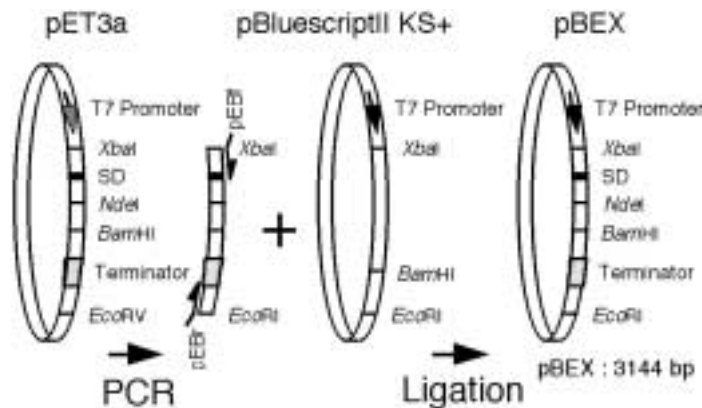


Fig. 11. New pBEX vector with superior character for high expression and copy in colon bacillus.

大腸菌の場合は、ヒトとコドンの使用頻度が異なるため、蛋白質のcDNAをそのまま用いても大量発現できない場合がある。そこで、あらかじめ大腸菌のコドン使用頻度にあわせて最適化した遺伝子を試験管内で全合成した。この方法により、既に多くのヘム蛋白質の大量発現に成功している。ヘモグロビンの場合、鎖、鎖に対応する遺伝子（Fig. 12.）をそれぞれ別個に合成し、ベクターにつなぎ込む（Fig. 13.）。これらのベクターは強力なT7プロモーターを共通に有しているため、rHbの大量発現が可能となる。



Fig. 12. Synthetic cDNA of hemoglobin and chain with codon sequence adapted to colon bacillus.

培養条件をTable 3.に示したが、この条件で培地1 L当たり、g単位のrHbの発現が可能となっている。

Table 3. List of culture condition employed

Host :Colon Bacillus strain BL21Gold(DE3)
Culture medium:Terrific Broth
Culture temperature:30
Revolution of shaking:120rpm
Additive:hemin or aminolevulinic acid

(2) rHb発現の確認

Fig. 14.及び15.に、得られたrHbのnative-PAGE及びマズスペクトルの測定結果をそれぞれ示した。これらの結果から発現した蛋白質が確かにヘモグロビンと同一の分子量であるとともに鎖と鎖が1：1の比率からなる四量体であることが示唆された。現在、構造の詳細検討並びに特性解析を行うとともに、大量製造へ向けた準備を進めている段階である。

Fig. 16.には、秋田県大館市で拡張中の当社の注射剤製造工場の概観を示した。現在、この無菌製剤工場に隣接して人工酸素運搬体の製造工場を設置する作業を進めている。

おわりに

以上述べた人工酸素運搬体は、当社二プロ、(株)オキシジェニクス、早稲田大学、慶應義塾大学及び熊本大学との共同研究で事業化に向けた開発が進められており、30年来蓄積された大学での基盤技術研究の成果が現実の医薬品（人工酸素運搬体）として輸血代替治療やその他様々な治療分野で使用される日がすぐそこに迫ってきている。

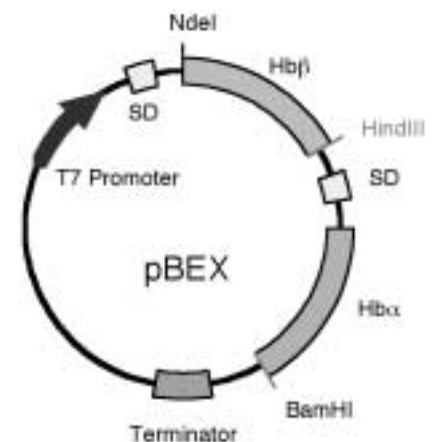


Fig. 13. Our original pBEX vector for co-expression of and chain in colon bacillus.

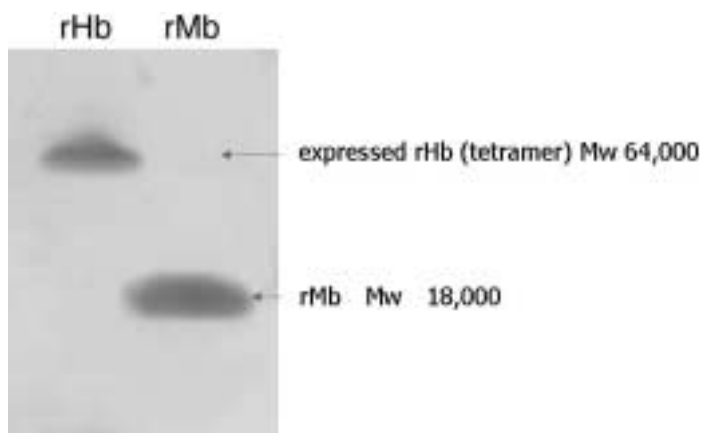


Fig. 14. Identification of expressed rHb (tetramer) by native-PAGE.

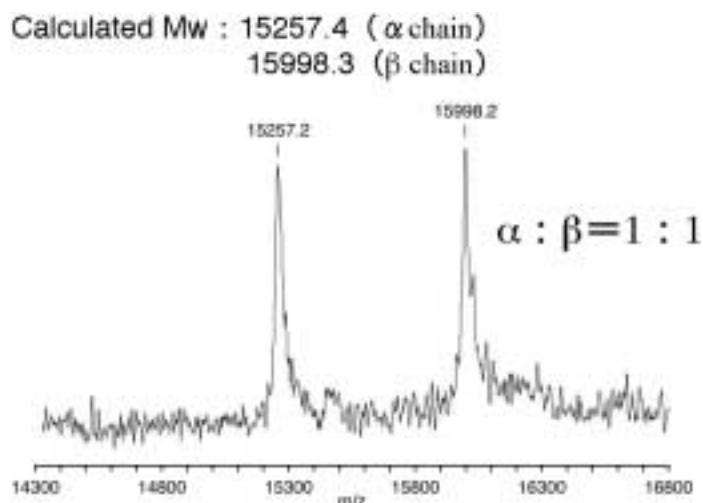


Fig. 15. MALDI-TOF-MS spectrum of expressed rHb.



Fig. 16. External appearance of pharmaceutical factory in NIPRO
New facilities for the production of artificial oxygen carriers will be constructed in this factory.

参考文献

1. Tsuchida E. Is there a need for blood substitutes in the new millennium and what should we expect in the way of safety and efficacy?. *Artif Cell Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000;28:v-xii.
2. Chang TMS. *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products, and Clinical Trials*. Basel, Karger 1997.
3. Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y, Hamamatsu K, Wu J. Human serum albumin incorporating tetrakis(*o*-pivalamido)phenylporphinato-iron() derivative as a totally synthetic O₂-carrying hemoprotein. *Bioconjugate Chem* 1999;10:797-802.
4. Komatsu T, Hamamatsu K, Tshchida E. Cross-linked human serum albumin dimers incorporating sixteen (tetraphenylporphinato)iron() derivatives: synthesis, characterization, and O₂-binding property. *Macromolecules* 1999;32:8388-8391.
5. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Kinetics of CO and O₂ binding to human serum albumin-heme hybrid. *Bioconjugate Chem* 2000;11:772-776.
6. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Reaction of nitric oxide with synthetic hemoprotein, human serum albumin incorporating tetraphenylporphinatoiron() derivatives. *Bioconjugate Chem* 2001;12:71-75.
7. Komatsu T, Okada T, Moritake M, Tsuchida E. O₂-binding properties of double-sided porphyrinatoiron()s with polar substituents and their human serum albumin hybrids. *Bull Chem Soc Jpn* 2001;74:1695-1702.
8. 小林薫, リコンビナントアルブミンの開発. *人工血液* 2000;8:1-5.
9. 甲斐俊哉, 土田英俊, 小林紘一. アルブミンヘムの開発と酸素輸液への応用. *人工血液* 2002;3:86.
10. Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y, Nakagawa A, Sakai H, Kobayashi K, Suematsu M. Human serum albumin incorporating synthetic heme: red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J Biomed Mater Res* 2003;64A:257-261.
11. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Effect of heme structure on O₂-binding properties of human serum albumin-heme hybrids: intramolecular histidine coordination provides a stable O₂-adduct complex. *Bioconjugate Chem* 2002;13:397-402.
12. Takeoka S, Sakai H, Terase K, Nishide H, Tsuchida E. Characteristics of Hb-vesicles and encapsulation procedure. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22:861-866.
13. Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Purification of concentrated hemoglobin using

- organic solvent and heat treatment. *Protein Expr Purif* 1993;4:563-569.
14. Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E. Physical properties of hemoglobin vesicles as red cell substitutes. *Biotechnol Prog* 1996;12:119-125.
 15. Naito Y, Fukutomi I, Masada Y, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Abe H, Hirayama J, Ikebuchi K, Ikeda H. Virus removal from hemoglobin solution using Planova membrane. *J Artif Organs* 2002;5:141-145.
 16. Fukutomi I, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Sakai K. Carbonylation of oxyhemoglobin solution (HbO₂ / HbCO) using a membrane oxygenator. *J Artif Organs* 2002;5:102-107.
 17. Sou K, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol) modification of the phospholipids vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol) lipid into the vesicles. *Bioconjugate Chem* 2000;11:372-379.
 18. Sakai H, Tomiyama KI, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol) conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjugate Chem* 2000;11:425-432.
 19. Przybelski RJ, Daily EK, Kisicki JC, Mattia-Goldberg C, Bounds MJ, Colburn WA. Phase I study of the safety and pharmacologic effects of diaspirin cross-linked hemoglobin solution. *Crit Care Med* 1996;24:1993-2000.
 20. Murray JA, Ledlow A, Launspach J, Evans D, Loveday M, Conklin JL. The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor functions in humans. *Gastroenterology* 1995;109:1241-1248.

編集後記

本号では、2005年4月から完全施行されている改正薬事法に関連した日本赤十字社の取組み、ヒト抗体やアルブミンの医薬品としての利用に関する総説のほか、人工酸素運搬体の開発動向に関する報告が開発企業からあった。来る6月6日、7日に開催される第12回日本血液代替物学会年次大会では、会告にあ

るように、これらの論文の内容に関連したシンポジウムやワークショップが企画されている。ぜひ、本号をお読み頂き、多くの会員の参加と討論を期待したい。また、発表者の方には本誌への積極的な投稿をお願いします。

(武岡 真司)

投稿規定

本誌は、血液代替物開発研究に貢献する論文、関連する情報、学会会員のための会報、学会諸規定等を掲載するが、形式にはこだわらず創意ある投稿を広く集める。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

執筆規定

ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよびテキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。
- 3) 総説、原著、および報告については、第2頁以降に和文抄録、Keywords(英文で6個程度)を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハード

- コピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(、)とピリオド(．)とする。
 - 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
 - 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N / 10などを用いる。
 - 7) FigureとTable: 引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
 - 8) 文献: 本文に引用した順序に番号を付け、文中では²⁾, ^{3,5)}, ^{1,4,6)}などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名・論文題名・誌名 西暦発行年; 巻数: 頁~頁. とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicus に準拠する。単行本の場合は全著者名・題名・編集者名・書名・発行地: 発行書店, 年号; 頁~頁. の順とする。
 1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
 2. 砂本順三, 岩本 清. リボソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リボソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
 3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular

- retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
 - 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
 - 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ著作権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

[本誌掲載著作物の二次利用および著作権について]
以下の点につきまして、あらかじめご了承ください。

本誌の一部、もしくは全部をCD-ROM、インターネットなどのニューメディアに二次利用させていただく場合があります。本誌に掲載する著作物の複製権・翻訳権・上映権・譲渡権・公衆送信権(送信可能化権を含む)は本学会に譲渡されたものとします。したがって、上記の諸権利の承諾は本学会で行います(本項については、著作者ご自身の再利用を拘束するものではありませんが、再利用される場合はご一報ください)。

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを越える分についての費用は著者の負担とする(およそ1部100円)。カラー写真掲載・アート紙希望などの場合は、著者の実費負担とする。

編集委員会

武岡真司(委員長), 東 寛, 池淵研二, 小林 薫, 酒井宏水, 福島昭二, 堀之内宏久, 村田 満, 渡辺真純

日本血液代替物学会 会誌

発行 日本血液代替物学会

編集・制作「人工血液」編集委員会

印刷 株式会社 研恒社

人工血液 vol.13(1) 2005年3月31日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL(03)5363-3493 FAX(03)5363-3499

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

早稲田大学理工学部65-208室

TEL(03)5286-3217 FAX(03)3205-4740

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

TEL(03)3265-8961 FAX(03)3264-1995

日本血液代替物学会
<http://www.blood-sub.jp/>